

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

POLLYANA PATRICIO COSTA

ECOLOGIA MOLECULAR DE *DESMODUS ROTUNDUS* (CHIROPTERA:
PHYLLOSTOMIDAE) NO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS, PARANÁ, BRASIL.

CURITIBA

2011

POLLYANA PATRICIO COSTA

ECOLOGIA MOLECULAR DE *DESMODUS ROTUNDUS* (CHIROPTERA:
PHYLLOSTOMIDAE) NO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS, PARANÁ, BRASIL.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zoologia, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas –
Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Pie

CURITIBA

2011

Ao morcego-vampiro-comum por sua capacidade cognitiva, suas múltiplas habilidades, sua destreza, que despertaram em mim respeito, admiração, dedicação e alteridade.

Àqueles que me ajudaram de alguma forma a ser quem eu sou e a tudo que alcancei.

SUMÁRIO GERAL

AGRADECIMENTOS.....	v
PRÓLOGO.....	vii
RESUMO GERAL.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
Capítulo 1: O morcego-vampiro-comum <i>Desmodus rotundus</i>.....	1
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO.....	6
JUSTIFICATIVA.....	17
OBJETIVOS.....	18
REFERÊNCIAS.....	19
Capítulo 2: Estrutura da população de <i>Desmodus rotundus</i> no Complexo Fadas-Jesuítas do Parque Estadual de Campinhos.....	28
RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
JUSTIFICATIVA.....	35
OBJETIVOS.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	58
Capítulo 3: Ecologia Molecular de <i>Desmodus rotundus</i> no Parque Estadual de Campinhos, Paraná, Brasil.....	63
RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	67
INTRODUÇÃO.....	68
JUSTIFICATIVA.....	78
OBJETIVOS.....	79
MATERIAL E MÉTODOS.....	80
RESULTADOS.....	88
DISCUSSÃO.....	94
CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS.....	99
EPÍLOGO	115

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Dr. Marcio R. Pie** que sempre me auxiliou, incentivou, ensinou e acreditou em mim e no meu trabalho. Também agradeço muito pela oportunidade, amizade, atenção e respeito dados a mim, sendo um exemplo de pessoa, pesquisador e orientador. Além do constante bom humor contrastado com a seriedade com que faz Ciência. Obrigada mesmo! *“Feliz e bom aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”*

Ao **Dr. Wilson Uieda** pela imensa contribuição à biologia de *D. rotundus*, sendo uma referência de pesquisador da espécie fora e dentro do Brasil. E pela seriedade, humildade, atenção e acessibilidade constante; bem como pelo aporte a este manuscrito.

Ao **Dr. José Francisco de Oliveira Neto** pela ajuda no laboratório e pela contribuição molecular para este estudo.

Ao **Dr. Fernando C Passos** por ter me auxiliado principalmente no início da minha vida acadêmica e por disponibilizar alguns equipamentos de campo, autorizações de captura e coleta, além da avaliação e contribuição para este estudo.

Ao pessoal do **Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos** pelo companheirismo. Principalmente ao Marcel K. Tschá pela imensa e intensa ajuda com a biologia molecular.

Ao **Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE)** por abrir as portas para mim e minhas amostras de morcegos. Principalmente ao Dr. Walter Böeger e Luciana Patella.

Ao **Laboratório de Biologia Molecular Danúncia Urban do Departamento de Zoologia** pelos equipamentos disponibilizados. Em especial à Paula, pela simpatia e auxílio técnico.

Ao pessoal do **Laboratório de Biodiversidade, Ecologia e Conservação de Animais Silvestres (LABCEAS)**, principalmente ao Diego Bilski (assessor de assuntos aleatórios), João Brito, Luana Munster, Nathalia Kaku-Oliveira e Kauê Cachuba.

À **Biogenomika** pelo auxílio técnico ao seqüenciador modelo MegaBACE. Em especial à Danyelle Stringari.

À **CAPES** pela bolsa de mestrado cedida a mim.

Ao **CNPq** pelo auxílio à pesquisa, sem o qual a metodologia molecular não poderia ser realizada.

Ao **IAP** pela autorização cedida à pesquisa na área de estudo e ao pessoal do **Parque Estadual de Campinhos** pelo carinho, simpatia e prontidão.

Ao **IBAMA** pela autorização cedida à captura e coleta dos espécimes e amostras biológicas.

Aos inúmeros **amigos e amigas biólogos** pelas horas de indagações filosóficas, ecológicas e evolutivas, bem como pela força, incentivo, companhia, desabafos, risadas, ajuda ou simplesmente pela amizade. *“Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir.”*

Aos **amigos que me ajudaram em campo**: Banana, Diego, Grazi, Nathi, Marcelo W., Marcelo R., Jennifer, João Brito, Bel, Luana, Kika, Kauê e Laura.

A **minha família e amigos não-biólogos** que compreenderam e acreditaram no meu trabalho, mesmo não entendendo a real finalidade [rsrs]... Principalmente aos meus pais que sempre apoiaram minhas escolhas e meus sonhos. *“Se pela genética metade de cada um de vós sou, as outras metades ainda lhes devo pelo amor devotado”*.

Ao querido **Robson** pelo amor e carinho, pela paciência, pelo apoio e incentivo, por me levar ao campo nas curvas da Estrada da Ribeira e até mesmo por ter se aventurado comigo no meio do mato de madrugada para ‘caçar vampiros’. E a tudo que ele representa na minha vida. *“Eu tenho tanto pra lhe falar, mas com palavras não sei dizer como é grande o meu amor por você”*.

“Alcançou o sucesso aquele que viveu bem, riu com frequência e amou muito.”

PRÓLOGO

Alvo de diversos mitos e crenças, os morcegos-vampiros há muito tempo têm sido lembrados pela humanidade. Um animal voador de hábito alimentar sangüívoro foi registrado já no século XVI, mas a identificação deste animal somente foi confirmada dois séculos depois¹. No entanto, mesmo atualmente, poucas pessoas têm conhecimento de que há mais de mil espécies de morcegos conhecidas no mundo e, ainda, que apenas três delas são hematófagas. Destas, somente o morcego-vampiro-comum tem sua biologia relativamente conhecida, principalmente devido aos prejuízos econômicos e à Saúde Pública. Já os morcegos frugívoros, insetívoros, carnívoros e nectarívoros historicamente despertaram um menor interesse científico.

Durante o final do século XX, obteve-se um grande passo para o conhecimento da biologia do morcego-vampiro-comum (*Desmodus rotundus*). Pesquisadores como Arthur M. Greenhall, Bernardo Villa-Ramirez, Dennis C. Turner, Gerhard Joermann, George C. Mitchell, Gerald S. Wilkinson, Guilherme Mann, Horacio Delpietro, Ivan Sazima, Rexford D. Lord, Merlin D. Tuttle, Raul Flores-Crespo, Rogério S. Piccinini e Uwe Schmidt foram fundamentais para noções sobre comportamento alimentar, reprodução, organização social, anatomia, fisiologia, citogenética etc. Em que pese muitos estudos importantes com *D. rotundus* tenham sido feitos desde essa época, atualmente pouco ainda é sabido acerca da ecologia molecular da espécie.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a estrutura da população e diversidade genética para contribuir com o conhecimento da Ecologia Molecular de *D. rotundus*. Para tanto, esta dissertação de mestrado foi organizada em três capítulos. O primeiro capítulo, intitulado “O morcego-vampiro-comum *Desmodus rotundus*”, tratará das características gerais, comportamento alimentar e reprodutivo, ecologia e saúde pública. O segundo capítulo “Estrutura da população de *Desmodus rotundus* no Complexo Fadas-Jesuítas do Parque Estadual de Campinhos”, tratará do desenho amostral, tamanho da população, condição reprodutiva e ontogenética, e padrão de atividade de forrageio. Já o terceiro capítulo, intitulado “Ecologia Molecular de *Desmodus rotundus* no Parque Estadual de Campinhos”, enfatizará o tamanho efetivo da população, os prováveis graus de parentesco entre os indivíduos da população e os níveis de diversidade genética encontrados.

¹TUTTLE, M. D. 1988. Introduction to the Natural History of Vampire Bats. In: **Natural history of vampire bats**. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 1-6, 1988.

RESUMO GERAL

O morcego-vampiro-comum (*D. rotundus*) é a espécie de morcego cuja biologia é mais bem conhecida uma vez que causa prejuízos à agroeconomia e à saúde pública. É abundante e distribui-se desde o sul do México até o Uruguai e norte da Argentina. São capturados durante todo o ano, sendo comumente encontrados em ambientes cavernícolas, no Brasil, em colônias de dez a quinze indivíduos. A organização social é do tipo hierarquia de dominância, com a formação de pequenos haréns. A poliestria assazonal maximiza o sucesso reprodutivo da espécie. Mesmo sendo alvo de muitos estudos, ainda há uma lacuna importante no que tange aspectos genéticos da espécie, principalmente quanto à Ecologia Molecular. Logo, este estudo tem como objetivo geral avaliar a estrutura da população e diversidade genética para contribuir com o conhecimento da Ecologia Molecular de *D. rotundus*. A captura dos espécimes foi realizada no fragmento de floresta ombrófila mista do Parque Estadual de Campinhos (PEC) (25°02' S e 49°05' W), a 63 km de Curitiba, Paraná. O PEC possui cerca de 580 hectares e contempla o complexo de grutas (Conjunto Fada-Jesuítas) de 1527 metros de desenvolvimento. As 14 fases de campo entre o período de junho de 2007 a maio de 2008 e junho de 2009 a março de 2010, totalizando um esforço de captura de 300h/rede. Foram armadas seis redes de neblina rentes ao chão, na entrada e no entorno das cavernas do PEC. Foram capturados 199 espécimes (incluindo recapturas) durante todos os meses, inclusive em baixas temperaturas. Indivíduos jovens foram encontrados durante todo o ano, bem como aqueles ativos sexualmente, não havendo estação reprodutiva bem definida. A taxa de recaptura de 30% demonstrou fidelidade pelo abrigo e locais de forrageio. O padrão de atividade de forrageio se deu por um pico de atividade na primeira hora da noite (saída do abrigo), outros na sexta e oitava hora e um último ao amanhecer (retorno ao abrigo). Além disso, foram observados movimentos locais entre as cavernas amostradas. A partir dos dados analisados no *software* CAPTURE, a estimativa de tamanho populacional de *D. rotundus* para o Parque Estadual de Campinhos, considerado o modelo que melhor se ajustou aos dados para machos e fêmeas simultaneamente (modelo M_{th}) foi de 365 indivíduos. Dos 199 indivíduos capturados, em 49 houve retirada de amostra pouco invasivas de material biológico (sangue e tecido da asa) para estudos moleculares. A extração do DNA nas amostras de tecido da asa foi utilizado o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®); já nas amostras de sangue foi extraído diretamente do kit Cartão de DNA (MGM®). Ambas foram submetidas à amplificação através da técnica de PCR. Foram utilizados oito *loci* de microssatélites desenvolvidos por Piaggio *et al.* (2008), sendo o conjunto de *primers* multiplex 1 e 3. Logo, foi realizado a genotipagem dos microssatélites em sequenciador modelo ABI 3130. O tamanho dos alelos gerados pela genotipagem foram analisados no programa GeneMarker v.1.6. Cervus 3.0 foram calculadas as frequências alélicas observadas. Os dados de diversidade alélica, graus de parentesco e tamanho efetivo da população (N_e) foram gerados no programa Colony 2.0.0.1, adotando *full-likelihood*. Os oito *loci* analisados revelaram-se polimórficos para a espécie, sendo que foi encontrado um total de 35 alelos, sendo Dero_D02F o *locus* mais

polimórfico (6 alelos diferentes) e o Dero_B11F o menos (2 alelos). Apenas o *locus* Dero_A08F apresentou desvio significativo entre a proporção de heterozigotos observada e esperada. A heterozigidade observada para cada um dos oito *loci* apresentou frequência alélica igual a 0.250, 0.609, 0.133, 0.370, 0.875, 0.417, 0.421 e 0.091. Assim, notou-se significativa frequência alélica de homozigotos encontrada em alguns dos *loci*, podendo acarretar danos a espécie. Isto porque diminui a diversidade alélica, podendo causar exposição de genes prejudiciais e até mesmo deletérios, e até mesmo uma futura extinção local. Quanto à avaliação molecular de parentesco, dois irmãos de pai e mãe foram encontrados em duas ocasiões ($p \approx 1$) e em outras duas ocasiões ($1 < p < 0.80$). Quatro irmãos de pai e mãe: em apenas uma ocasião, com $p \approx 1$. E cinco irmãos de pai e mãe: em apenas uma ocasião, com $p \approx 1$. Quatro descendentes tiveram pai e mãe encontrados, isto é, genotipados. E mais outros quatro foram inferidos como filhos de mesma mãe. Quanto à análise de parentesco, foram encontrados cinco agrupamentos possíveis. O primeiro apresenta quatro indivíduos: pai, mãe e dois descendentes ($p = 0.34$). O segundo apresenta cinco indivíduos: pai, mãe e três descendentes ($p = 0.27$). O terceiro, sete indivíduos: pai, mãe e cinco descendentes ($p \approx 1$). O quarto, cinco indivíduos: pai, mãe e três descendentes ($p = 0.22$). O quinto, cinco indivíduos: pai, mãe e três descendentes ($p = 0.62$). Já o tamanho efetivo da população para os 49 indivíduos genotipados foi de nove, assumindo método de verossimilhança (*full likelihood*). Ou seja, para a genética de populações, há apenas nove genótipos distintos na população do PEC. A estimativa de N_e , associada aos efeitos e da frequência de eventos de controle populacional indiscriminados, são de preocupação para a sobrevivência de populações de *Desmodus rotundus* no local. Portanto, devem ser levados em consideração em futuras tentativas de conservação e proteção localmente ao longo de toda a distribuição da espécie, antes mesmo que estas populações estejam ameaçadas. Este estudo foi o primeiro a utilizar marcadores moleculares de alta resolução (microssatélites) para examinar os padrões de parentesco e tamanho efetivo da população de machos em *Desmodus rotundus*, provendo dados mais detalhados sobre o comportamento da reprodução da espécie. Diante da acuidade da diversidade genética para as espécies e/ou populações animais e as possíveis consequências de alterações em seus padrões naturais, estudos genéticos nesse âmbito envolvendo a caracterização dos níveis de variabilidade genética e dentro das populações e espécies são de suma importância.

Palavras-chave: Estrutura populacional. Censo. Tamanho efetivo populacional. Paternidade.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: MORFOLOGIA EXTERNA DO MORCEGO-VAMPIRO-COMUM. A) Foto evidenciando o porte médio, o polegar alongado e com calosidades, o antebraço longo, o ventre de coloração acinzentada; B) Foto evidenciando o lábio inferior sulcado, incisivos superiores pontiagudos, folha nasal em formato de ferradura, dorso de coloração amarronzada. Escala: 1 cm.....8

FIGURA 2: MORCEGO-VAMPIRO-COMUM NO INTERIOR DA GRUTA DA FADA, NO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS, BRASIL. A) Foto a cerca de 6 metros de distância do morcego. B) Detalhe. Escala: 5 cm.....8

CAPÍTULO 2

FIGURA 1: MAPA DA LOCALIZAÇÃO DO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS (PEC). Situado na região do Vale do Ribeira, entre os municípios de Tunas do Paraná e Cerro Azul, a 63 km da capital paranaense, Curitiba.....37

FIGURA 2: COMPLEXO DE GRUTAS DO PEC: CONJUNTO FADA/JESUÍTAS. Mapa topográfico do Conjunto Fada/Jesuítas, sendo que cada coloração representa um mesmo nível de carstificação. Foto aérea do Conjunto Fada/Jesuítas composto por: A) Ressurgência da Gruta dos Jesuítas; B) Sumidouro da Gruta dos Jesuítas; C) Gruta Abismo Professor Schiebler; e D) Gruta da Fada.....38

FIGURA 3: SUMIDOURO DA GRUTA DOS JESUÍTAS. Devido à visitação no PEC, sofre grande impacto antrópico. A) Vista interior da entrada, a qual possui cerca de 7 m de largura e 9 m de altura, nas maiores dimensões. B) Vista lateral de uma rede de neblina (*mist-net*) armada fechando a entrada da caverna.....40

FIGURA 4: GRUTA DA FADA. A) Vista exterior da entrada, a qual possui cerca de 6 m de largura e 2 m de altura, nas maiores dimensões. B) Ao fundo, a entrada da Gruta da Fada vista da entrada da Gruta do Abismo Professor Schiebler, as quais são separadas cerca de 40 m de distância pela dolina.....40

FIGURA 5: SEQUÊNCIA DA METODOLOGIA UTILIZADA DURANTE AS CAPTURAS. A) Retirada do espécime da rede de neblina; B) Acondicionamento em saco de algodão; C) Medida de antebraço com uso de um paquímetro; D) Tomadas informações reprodutivas e ontogenéticas (nesta considerando o grau de ossificação das epífises dos metacarpos e falanges); E) Marcação individual no patágio e colocação da anilha numerada “UFPR Zool”; F) Soltura do espécime. Escala: 5 cm.....41

FIGURA 6: PADRÃO DE ATIVIDADE DE *DESMODUS ROTUNDUS* NO PEC DURANTE OS PERÍODOS DE JUNHO DE 2007 A MAIO DE 2008 E JUNHO DE 2009 A MARÇO DE 2010. Sendo que no primeiro período as redes de neblina eram abertas das 21h00 ao amanhecer e no segundo, das 19h00 ao amanhecer.....47

FIGURA 7: EVIDÊNCIA DO ATAQUE DE PREDADOR A MORCEGO EM REDE DE NEBLINA. A) Espécime de *Desmodus rotundus* encontrado morto na rede de neblina armada na Gruta da Fada. B) Captura do predador com armadilha do tipo gaiola, armada ao lado da rede de neblina. Trata-se de *Philander frenatus*, conhecida como cuíca-de-quatro-olhos.....48

FIGURA 8: MAPA TOPOGRÁFICO DA GRUTA DA FADA EVIDENCIANDO OS AGRUPAMENTOS DE D. ROTUNDUS ENCONTRADOS EM 16/FEV/10. Quando possível, os indivíduos foram identificados como machos, fêmeas e/ou jovens e adultos. Sendo “F” para fêmeas, “FA” para fêmeas adultas, “M” para machos, “MJ” para machos jovens, “MA” para machos adultos e “n/i” para indivíduos não puderam ter sido identificados sexo e condição ontogenética.....49

FIGURA 9: INTERIOR DA GRUTA DA FADA DO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS - PR. A) Evidência do uso da caverna como abrigo diurno por cinco indivíduos de *Desmodus rotundus*. B) Detalhe de um indivíduo macho de *D. rotundus* com marcação individual feita no antebraço direito por anilha metálica numerada.....49

FIGURA 10: MÉDIA DO TAMANHO DO ANTEBRAÇO EM FÊMEAS E MACHOS DE DESMODUS ROTUNDUS NO PEC.....50

CAPÍTULO 3

FIGURA 1: MAPA DA LOCALIZAÇÃO DO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS (PEC). Situado na região do Vale do Ribeira, entre os municípios de Tunas do Paraná e Cerro Azul, a 63 km de capital paranaense, Curitiba.....80

FIGURA 2: SEQÜÊNCIA DA METODOLOGIA UTILIZADA DURANTE AS CAPTURAS. A) Retirada do espécime da rede de neblina; B) Acondicionamento em saco de algodão; C) Tomadas informações reprodutivas e ontogenéticas (nesta considerando o grau de ossificação das epífises dos metacarpos e falanges). Escala: 5 cm.....82

FIGURA 3: SEQÜÊNCIA DA METODOLOGIA DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO. A) Amostra de sangue foi coletada da veia de maior calibre da região do propatágio, utilizando uma agulha de insulina, mantendo em papel filtro do kit Cartão de DNA da MGM®; B) Amostra de tecido da asa (pedaço de cerca de 4 mm), retirada com a ajuda de uma pinça de ponta fina esterilizada; C) Evidência de cicatrização da asa de um indivíduo que havia tido um pedaço da asa retirado 30 dias antes. D) Soltura do espécime. Escala: 5 cm.....83

FIGURA 4: ELETROFEROGRAMA PRODUZIDO PELO SEQUENCIADOR MODELO ABI 3130 NO PROGRAMA GENEMARKER ILUSTRANDO A DIVERSIDADE GENÉTICA EM UM LOCUS DE MICROSSATÉLITES ENTRE ESPÉCIMES DE D. ROTUNDUS. Indivíduo esq051 (fêmea) apresentando dois picos de intensidade, sendo, portanto, um heterozigoto. Indivíduo esq050 (fêmea) apresentando um pico, sendo um homozigoto. Indivíduo dir048 (macho) apresentando dois picos subsequentes, sendo um heterozigoto.....86

FIGURA 5: HISTOGRAMA ILUSTRANDO A DIVERSIDADE GENÉTICA E A DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENCONTRADAS PARA CADA UM DOS OITO *LOCI* DE MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA *DESMODUS ROTUNDUS*.....91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1: LOCAIS AMOSTRADOS COM REDES DE NEBLINA NO PEC E RESPECTIVO ESFORÇO E FREQUÊNCIA DE CAPTURA. Sendo: frequência absoluta (F_{absoluta}) e frequência relativa (F_{relativa}) dos indivíduos de *D. rotundus* encontrados.....44

TABELA 2: NÚMERO DE INDIVÍDUOS, CONDIÇÃO ONTOGENÉTICA E REPRODUTIVA DE *D. ROTUNDUS* CAPTURADAS NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2007 A MAIO DE 2008 E JUNHO DE 2009 A MARÇO DE 2010, NO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS. Sendo “TA” os espécimes cujos testículos se encontravam na cavidade abdominal; “TE” espécimes cujos testículos estavam visivelmente na bolsa escrotal; “nulípara” a fêmea que ainda não esteve grávida; “múltipara” a fêmea que já tendo tido pelo menos uma gravidez; “lactante” aquela com mamas aleitadas; “pós-lact” aquela com mamas túrgidas e sem pêlos ao redor; “grávida” aquela com feto diagnosticado por apalpação.....45

TABELA 3: TESTE PARA POPULAÇÕES FECHADAS UTILIZANDO O PROGRAMA CAPTURE. Demonstrando valores para Z do teste de *Jackknife* e significância da probabilidade de captura por ocasião (p) e os valores encontrados para cada um dos modelos. *Modelo mais apropriado.....50

TABELA 4: TAMANHO POPULACIONAL ESTIMADO EM DECORRÊNCIA DA SELEÇÃO DO MODELO MAIS APROPRIADO, UTILIZANDO O PROGRAMA CAPTURE. Sendo I.C. o intervalo de confiança do número de indivíduos estimado.....50

CAPÍTULO 3

TABELA 1: NÚMERO DE INDIVÍDUOS, CONDIÇÃO ONTOGENÉTICA E REPRODUTIVA DE *D. ROTUNDUS* CAPTURADAS NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2009 A MARÇO DE 2010, NO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS. Para os machos, inativos eram os espécimes cujos testículos se encontravam na cavidade abdominal; e ativos aqueles cujos testículos estavam visivelmente na bolsa escrotal. Fêmeas inativas eram aquelas não estavam grávidas ou lactantes; e ativas aquelas com mamas aleitadas, com mamas túrgidas e sem pêlos ao redor (pós-lactantes) ou com feto diagnosticado por apalpação (grávidas).....88

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA *DESMODUS ROTUNDUS* (N=49). Número de alelos por *locus* (k), número de indivíduos no qual o alelo foi observado (N), tamanho dos fragmentos de DNA gerados por PCR (pb = pares de base), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e), supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg. *Dados retirados de Piaggio *et al.* (2008).....90

TABELA 3: CARACTERÍSTICAS DOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA *DESMODUS ROTUNDUS* (N = 49). Número de indivíduos no qual

o alelo foi observado (N) e número de heterozigotos e homozigotos encontrados na população.....90

TABELA 4: CARACTERÍSTICAS DOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA *DESMODUS ROTUNDUS* (N = 49) NAS DIFERENTES CONDIÇÕES ONTOGENÉTICAS. Número de indivíduos no qual o alelo foi observado (N) e número de heterozigotos e homozigotos (frequência relativa de homozigotos por *locus*) encontrados na população.....90

TABELA 5: ATRIBUIÇÃO DE GRAUS DE PARENTESCO AOS AGRUPAMENTOS FAMILIARES DE *DESMODUS ROTUNDUS* GERADOS A PARTIR DO PROGRAMA COLONY. Considerando que paternidade e maternidade são candidatos a pais e mães dados os filhotes irmãos encontrados, sendo p a probabilidade. Apesar de inferida a maternidade, a mãe não fora capturada e genotipada por este estudo (#). O mesmo foi utilizado para a paternidade (*). A atribuição individual (ID) foi realizada na sequência em que os indivíduos eram capturados em campo, sendo que machos (dir = anilha no antebraço direito) e fêmeas (esq = anilha no antebraço esquerdo) tinham numeração independente entre si.....92

Capítulo 1: O morcego-vampiro-comum *Desmodus rotundus*.

Modern Biology has produced a genuinely new way of looking at the world (...) to the degree that we come to understand other organisms, we will place a greater value on them, and on ourselves.

Edward O. Wilson

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Os MORCEGOS HEMATÓFAGOS	6
1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>D. ROTUNDUS</i>	7
1.3 ECOLOGIA.....	9
1.4 COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	10
1.5 COMPORTAMENTO SOCIAL	12
1. 6 COMPORTAMENTO REPRODUTIVO	13
1.7 <i>D. ROTUNDUS</i> E A SAÚDE PÚBLICA.....	14
1.8 GENÉTICA	14
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVO	18
REFERÊNCIAS	19

RESUMO

Dentre mais de mil espécies de morcegos registradas mundialmente, a Subfamília Desmodontinae (Chiroptera, Phyllostomidae), endêmica da região Neotropical, contempla as três espécies de morcegos hematófagos conhecidas: *Diaemus youngi*, *Diphylla ecaudata* e *Desmodus rotundus*. Assim, este capítulo tem como objetivo descrever as características gerais, ecologia, comportamento alimentar e reprodutivo de *D. rotundus* já descritos na literatura. O morcego-vampiro-comum (*D. rotundus*) é a espécie de morcego cuja biologia é mais bem conhecida uma vez que causa prejuízos à agroeconomia (por causar anemia, baixo peso e até mesmo a morte da presa) e à saúde pública (pela transmissão de diversas doenças, principalmente a raiva). É abundante e distribui-se desde o sul do México até o Uruguai e norte da Argentina. Possui pelagem acinzentada, folha nasal em ferradura, lábio inferior sulcado, porte médio e polegar longo e com calosidades. A especialização alimentar acarretou numa peculiar modificação anatômica, fisiológica e comportamental. Apresenta também uma grande capacidade cognitiva e órgãos dos sentidos eficientes, os quais lhe permitem um comportamento ágil e versátil, sendo capaz de andar, saltar e correr com facilidade quando comparados a outros morcegos. É capturado durante todo o ano, sendo comumente encontrados em ambientes cavernícolas, no Brasil, em colônias de dez a quinze indivíduos. A organização social é do tipo hierarquia de dominância, com a formação de pequenos haréns. A poliestria assazonal maximiza o sucesso reprodutivo da espécie. Mesmo sendo alvo de muitos estudos, ainda há uma lacuna importante no que tange aspectos genéticos da espécie, principalmente quanto à Ecologia Molecular.

Palavras-chave: *Desmodus rotundus*. Morcego. Hematófago. Saúde pública.

ABSTRACT

Among more than a thousand recorded species of bats worldwide, Subfamily Desmodontinae (Chiroptera, Phyllostomidae), endemic to the Neotropical region and comprises three species of bats hematophagous known: *Diaemus youngi*, *Diphylla ecaudata* and *Desmodus rotundus*. Thus, this chapter aims to describe the general characteristics, ecology, feeding behavior and reproduction of *D. rotundus* already described in the literature. The common vampire bat, (*D. rotundus*) is the bat species whose biology is better known, because it causes damage to the agro-economics (to cause anemia, low weight and even death of the prey) and public health (by transmission of several diseases, especially rabies). It is abundant and distributed from southern Mexico to Uruguay and northern of Argentina. It has gray hair, leaf nasal horseshoe, grooved lower lip, medium and long thumb and calluses. The feeding specialization resulted in a peculiar anatomic modifications, physiological and behavioral. It also feature a large cognitive capacity efficient and senses, which allow you to conduct an agile, versatile, being able to walk, jump and run easily when compared to other bats. It is captured throughout the year, and is commonly found in Brazilian cave environments in colonies of about fifteen individuals. The social organization is the kind of dominance hierarchy, with the formation of small harems. The poliestric assazonal maximizes the reproductive success of species. Even the subject of many studies, there is still a significant gap in terms of its genetic species, especially regarding the Molecular Ecology.

Palavras-chave: *Desmodus rotundus*. Bat. Hematophagous. Public health.

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS MORCEGOS HEMATÓFAGOS

Pertencentes à Ordem Chiroptera, os morcegos são os únicos mamíferos que apresentam estruturas especializadas que permitem um voo verdadeiro. Há cerca de 1200 espécies de morcegos no mundo, sendo no Brasil entre 145 e 168, dependendo do arranjo taxonômico (TADDEI, 1996; MIRANDA *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2007). Na região Neotropical, as comunidades de morcegos são altamente estruturadas, sendo caracterizadas pela alta diversidade das espécies (KALKO, 1998). Dentre as nove famílias presentes no Brasil (todas pertencentes à subordem Microchiroptera), a Família Phyllostomidae, endêmica do Novo Mundo, possui a maior diversidade de hábitos alimentares (GARDNER, 1977). Além disso, apresenta a maior diversidade de táxons, sendo 90 espécies reconhecidas em 40 gêneros (REIS *et al.*, 2007).

Pertencentes à Subfamília Desmodontinae, família Phyllostomidae, as espécies de morcegos hematófagos: *Desmodus rotundus* (É. Geoffroyi, 1810), *Diphylla ecaudata* Spix (1823) e *Diaemus youngi* (Jentink, 1893) são restritas à região Neotropical. *Desmodus rotundus* e *D. ecaudata* são comuns em locais com cavernas, já *D. youngi* é tipicamente encontrado em ocos de árvores (DALQUEST, 1955; AGUIAR, 2007). Possuem folha nasal reduzida e em forma de ferradura. Apresentam também cauda ausente; uropatágio rudimentar; pernas, antebraços e polegar longos; incisivos superiores longos e cortantes; lábio inferior e língua sulcados (exceto em *D. youngi*); estômago e rins especializados na absorção e processamento do plasma sangüíneo (BERNARD, 2005). Da mesma forma que os outros microquirópteros, os morcegos hematófagos emitem sinais de ecolocalização para orientação espacial. A audição destes, no entanto, é adaptada às frequências entre 100 Hz e 10 kHz (SCHMIDT *et al.*, 1991).

Antes do século XVI, os animais silvestres e os humanos nativos eram as fontes de alimento dos morcegos hematófagos na região neotropical (GREENHALL, 1965, 1988; VILLAR., 1966). No entanto, após meados de 1500, a colonização européia introduziu os animais domésticos e de criação, possibilitando um aumento populacional progressivo destes morcegos (CRESPO *et al.*, 1961; GREENHALL, 1988). Isto porque estes animais introduzidos tornaram-se presas potenciais fáceis, por serem abundantes e acessíveis (CRESPO *et al.*, 1961; GREENHALL, 1965; TURNER, 1975).

Os integrantes desta Subfamília se alimentam gradativamente de sangue a partir dos 4 meses de idade, até que na fase adulta passam a se alimentar exclusivamente de sangue, não conseguindo sobreviver mais de três dias sem ele (FREITAS, 2000). O sangue é um tipo de alimento que exige características específicas para seu consumo e, por isso, os desmodontíneos têm várias adaptações singulares (KUNZ & FENTON, 2005). A dentição, por exemplo, é bem distinta de outros morcegos, já que seus dentes incisivos são maiores, em formato de estilete, mais afiados e projetados para frente. Isto permite que o animal retire pequenos pedaços de pele e tecido das presas, para obter seu alimento (GREENHALL *et al.*, 1983), o qual apresenta alta concentração de proteína e baixa concentração de gorduras e carboidratos (McFARLAND & WIMSATT, 1969). Vários autores registraram os tipos de presa comumente utilizadas pelos morcegos hematófagos (VILLA-R., 1966; TURNER, 1975; TURNER, 1975 *apud* GREENHALL, 1970; SCHMIDT, 1995; KUNZ & FENTON, 2005). A maioria dos casos descreve que *D. ecaudata* se alimenta preferencialmente de aves, *D. youngi* de aves e mamíferos e *D. rotundus* de mamíferos de médio e grande porte.

Atualmente, os morcegos hematófagos têm sido alvo de autoridades científicas e governamentais, devido ao fato de serem vetores de doenças de animais domésticos e de criação, provocando perdas econômicas (MITCHELL *et. al.*, 1972). No Brasil os prejuízos à criação de animais, como a raiva dos herbívoros, atingem cerca de trinta milhões de dólares por ano. Por este motivo e por ser abundante e bem distribuído na América Latina, *D. rotundus* é a espécie de morcego melhor estudada e, conseqüentemente, a mais conhecida (UIEDA, 1987).

1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *D. ROTUNDUS*

O morcego-vampiro-comum *Desmodus rotundus* é um filostomídeo de ampla distribuição, ocorrendo do México ao Uruguai (GREENHALL *et al.*, 1983; BREDT *et al.*, 1999). No Brasil, pode-se dividir esta distribuição em quatro clados geograficamente distintos, suportados por análises filogenéticas, moleculares e estatísticas: Região Norte da Floresta Atlântica, Região Sul da Floresta Atlântica, Cerrado e Pantanal (MARTINS *et al.*, 2007). É considerada uma espécie abundante (ARITA, 1993); sendo que, para Turner (1975), as populações de *D. rotundus* parecem aumentar em habitats impactados.

Além do apêndice nasal em formato de ferradura, possui pelagem brilhante de coloração acinzentada, longo polegar com três calosidades e lábio inferior sulcado (**Figura 1**).

Apresenta: porte médio, entre 25 e 40 g de massa corpórea, antebraço de 52 a 60 mm e fórmula dentária: $i \ 1/2$, $c \ 1/1$, $pm \ 1/2$, $m \ 1/1 = 20$ (VIZOTTO & TADDEI, 1973; GREENHALL *et al.*, 1983; BREDT, 1998).



FIGURA 1: MORFOLOGIA EXTERNA DO MORCEGO-VAMPIRO-COMUM. A) Foto evidenciando o porte médio, o polegar alongado e com calosidades, o antebraço longo, o ventre de coloração acinzentada; B) Foto evidenciando o lábio inferior sulcado, incisivos superiores pontiagudos, folha nasal em formato de ferradura, dorso de coloração amarronzada. Escala: 1 cm.

Estes morcegos utilizam cavernas, ocos de árvores e fissuras em rochas como abrigos diurnos (CRESPO *et al.*, 1961; GREENHALL *et al.*, 1983) (**Figura 2**). E embora não seja um fato comum, já foram registradas colônias com mais de 100 indivíduos (UIEDA *et al.*, 1996) e cerca de 300 indivíduos (SAZIMA, 1978; TADDEI *et al.*, 1991; BREDT *et al.*, 1998). Quando uma colônia sofre perturbações constantes num curto período de tempo, ela costuma abandonar o abrigo (DALQUEST, 1955). Quanto à longevidade, há registros de até 29 anos em cativeiro e mais de 16 anos na natureza (TRAPIDO, 1946; DELPIETRO *et al.*, 1992; WEIGL, 2005).

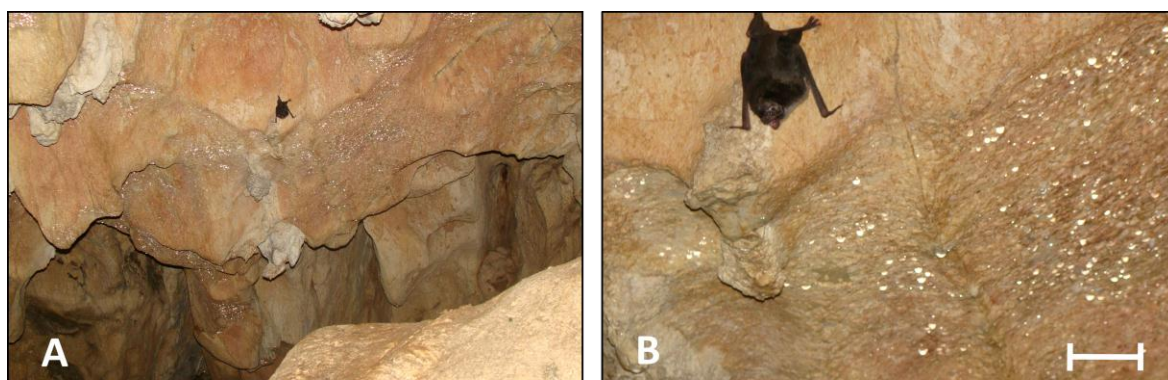


FIGURA 2: MORCEGO-VAMPIRO-COMUM NO INTERIOR DA GRUTA DA FADA, NO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS, BRASIL. A) Foto a cerca de 6 metros de distância do morcego. B) Detalhe. Escala: 5 cm.

Outras peculiaridades da fisiologia deste morcego são devidas ao fato de que possui estômago com ceco extremamente alongado, que permite ao animal estocar uma considerável quantidade de sangue (MCFARLAND & WIMSATT, 1969); e de que contém na saliva um anticoagulante e um ativador plasminogênico (trombolítico) que acarretam na dissolução de coágulos sanguíneos de aves e de mamíferos (HAWKEY, 1966, 1967; CARTWRIGHT, 1974; DiSANTO, 1960 *apud* TURNER, 1975; GOHLKE *et al.*, 1996).

Em virtude do hábito sangüívoro, *D. rotundus* é de suma importância para a saúde pública e para a agroeconomia na América Latina, principalmente pela transmissão de doenças como a raiva (ACHA & MÁLAGA-ALBA, 1988). Isto porque as presas mais comumente utilizadas por ele incluem animais de criação, como eqüinos, caprinos, suínos e bovinos (GREENHALL *et al.*, 1983).

1.3 ECOLOGIA

É uma espécie de comportamento versátil (SAZIMA, 1978), a qual foi a mais favorecida pela introdução de animais domésticos e de criação na região neotropical (GREENHALL, 1974; GONZÁLEZ & MITCHELL, 1976; ACHA & MÁLAGA-ALBA, 1988). Isto porque pode provocar prejuízos como a diminuição da qualidade do couro, o enfraquecimento e a perda de peso do gado, infecções de microorganismos (bactérias, fungos e vírus) e mífases nos ferimentos (CONSTANTINE, 1970; 1988; GITTI, 2007).

Desmodus rotundus geralmente forrageiam pouco se comparado a outros morcegos, sendo entre 3 a 8 km ao redor do abrigo (FLEMING *et al.*, 1972; CRESPO *et al.*, 1972; GREENHALL *et al.*, 1983). São capazes de voar à sombra da copa das árvores (MITCHELL *et al.*, 1973) e portanto podem ser encontrados independentemente das fases da lua (LAVAL, 1970). Da mesma forma, são encontrados em todos os meses do ano, inclusive em noites frias, sendo que não há indícios de migrações estacionais, hibernação ou estivação (CRESPO *et al.*, 1961; WIMSATT, 1962; UIEDA, 1982; GREENHALL *et al.*, 1983).

A umidade relativa do ar pode influenciar na escolha do abrigo diurno de *D. rotundus* (VILLA-R., 1966; MCFARLAND & WIMSATT, 1969; TRAJANO, 1981), por isso as cavernas tornam-se locais adequados, uma vez que a umidade é sempre superior à 50% e a temperatura é amena. Esta preferência de abrigo ocorre provavelmente porque há uma alta

taxa de perda de água no morcego-vampiro por evaporação durante o dia (MCFARLAND & WIMSATT, 1969; MCNAB, 1973).

São muito ágeis, podendo caminhar verticalmente ou horizontalmente, correr e saltar com grande facilidade (DALQUEST, 1955; TURNER, 1975; ALTENBACH, 1988; RISKIN & HERMANSON, 2005; RISKIN *et al.*, 2006). Todavia um morcego hematófago bem alimentado perde parte de sua agilidade, já que o excesso de sangue ingerido prejudica o voo (DITMARS & GREENHALL, 1935; MCFARLAND & WIMSATT, 1969; WIMSATT, 1969). Para SAZIMA (1978), a diminuição do peso em pousos noturnos temporários é energeticamente importante, porque diminui os gastos durante o voo de retorno ao abrigo diurno. E por consumirem um alimento rico em nitrogênio – o sangue – o vampiro também é forçado a excretar uma urina muito concentrada (TURNER, 1975).

1.4 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O padrão de atividade inicia-se nas primeiras horas da noite, com pico de atividade na segunda hora da noite (MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1989). Forrageiam apenas uma vez por noite (DALQUEST, 1955; WIMSATT, 1969; TURNER, 1975), ou seja, quando há dois picos de atividade acredita-se que dois grupos diferentes iniciaram o forrageio em horários distintos (WIMSATT, 1969). Alguns autores inferem que isto ocorre, pois alguns indivíduos de cada grupo fazem um voo preliminar para analisar a luminosidade da lua e as condições climáticas e do tempo (CRESPO *et al.*, 1961).

Têm ainda uma acuidade visual comparável a de alguns roedores noturnos, sendo bem provável que usem a visão para orientação a longa distância. Já a acuidade olfativa é similar a de outros pequenos mamíferos, mas é mais sensível que a de um morcego insetívoro, por exemplo. Assim sendo, estes morcegos poderiam localizar as áreas de repouso das presas pelo cheiro de estrume (UEDA, 1982) e, posteriormente, detectá-las visualmente pelo menos a 130 metros de distância (TURNER, 1975).

Dispõem ainda de mais um recurso: um sensor de calor. Pequenas fossetas isoladas termicamente (órgão de Jacobson ou vomeronasal), situadas no focinho do animal, o ajudam a detectar pontos mais quentes, como os locais onde os vasos sanguíneos estão mais próximos da superfície da pele, o que certamente ajuda a escolher o melhor local para a mordida na presa (TURNER, 1975; BERNARD, 2005). Aproximam-se das presas em grupos de dois a oito indivíduos, sendo que geralmente estão abrigados em locais próximos a estas (GREENHALL *et*

al., 1971; TURNER, 1975). Turner (1975) também acredita que os machos são territorialistas, pois ficam voando nas proximidades da presa para defendê-la de outros morcegos hematófagos.

Animais domésticos e de criação são preferidos por este morcego, em comparação aos animais selvagens, pois esses são mais susceptíveis ao ataque e apresentam um suprimento de sangue maior (TURNER, 1975). Mas isto não impede que mamíferos arborícolas (macacos, ouriços, preguiças etc) ou terrestres (veados, antas, porcos-do-mato, capivara etc) sejam vítimas de ataques deste morcego, uma vez que este é silencioso antes e durante os ataques (CRESPO *et al.* 1971; CRESPO, 1982; UIEDA, 1994). Hospedeiros selvagens não-identificados foram encontrados em baixa quantidade no conteúdo estomacal de *D. rotundus*, quando utilizada a técnica da precipitação e hemoglutinação (VILLA-R., 1968; GREENHALL, 1972). Sangue de esquilo foi encontrado uma única vez por Greenhall (1972).

De modo geral, as mordidas de *D. rotundus* são praticadas por dois motivos básicos: como mecanismo de defesa e para a alimentação (UIEDA & DEBERALDINI, 2002). A mordedura de alimentação é indolor e caracteriza-se por um único ferimento superficial de formato elíptico com cerca de 3 mm, uma vez que são feitas principalmente com os incisivos superiores, os quais são alinhados e pontiagudos (DITMARS & GREENHALL, 1935; GREENHALL, 1972; BREDT *et al.*, 1998). Em alguns casos, inclusive, *D. rotundus* pode cuspir ou ingerir um pedaço da pele (epiderme, pêlos e parte da derme) retirado da presa, antes de iniciar sua refeição (TURNER, 1975; UIEDA, 1994). Junto com esse fragmento de pele, alguns vasos sangüíneos da derme são lesados e o sangue escoar para o ferimento (GREENHALL, 1972; UIEDA & DEBERALDINI, 2002).

O ato de tomar sangue se dá por um mecanismo de ingestão não conhecido em outros mamíferos. Apresenta dois sulcos longitudinais na face inferior da língua, sendo que ao tomar sangue, os bordos laterais da língua dobram-se para baixo, de tal maneira que a superfície fique convexa, tubular. “Com ligeiros movimentos de entrada e saída da língua da boca, forma-se um vácuo parcial na cavidade bucal e o sangue flui pelos sulcos longitudinais da face inferior da língua”, seguindo para a face superior da mesma no fundo da boca, de onde o sangue é deglutido. (BREDT *et al.*, 1998)

Mesmo após o morcego ter se afastado da presa, a ferida causada pela mordida continua a sangrar por algum tempo, isto por causa do anticoagulante (HAWKEY, 1966, 1967; CARTWRIGHT, 1974) que permite a fluidez do sangue. Isto possibilita a infestação de outros parasitos, como bactérias, vírus e vermes. *Desmodus rotundus* permanece junto ao gado de 9 a 40 minutos. Surpreendentemente, um morcego-vampiro-comum em vida livre consome em

média 15 mL de sangue por noite – ou seja, mais de 40% de seu peso (WIMSATT & GUERRIERE, 1962; MCFARLAND & WIMSATT, 1969).

Quando os animais domésticos são mantidos próximos à residência do proprietário, os seres humanos podem, eventualmente, ser atacados por *D. rotundus*, como vem acontecendo principalmente em algumas localidades do Norte do Brasil (BREDT *et al.*, 1998; MAYEN, 2003). Habitações humanas de madeira ou pau-a-pique com várias aberturas, sem energia elétrica e próximas a possíveis abrigos diurnos (cavernas, florestas etc) também contribuem para esta situação (SCHNEIDER *et al.*, 2001).

O comportamento de compartilhamento recíproco de alimento foi descrito por Wilkinson (1984). Este observou 110 ocorrências de regurgitação de alimento (sangue) entre morcegos em alguns abrigos na Costa Rica, sendo estas realizadas por mãe e prole (77% dos casos) ou por morcegos aparentados ou não. Nenhum destes casos ocorreu entre fêmeas adultas regurgitando para machos adultos dominantes ou vice-e-versa. Para o autor, a reciprocidade de alimentação permanece porque traz benefícios sociais e alimentares, uma vez que aumenta as interações sociais e afetivas entre os indivíduos e auxilia na alimentação daquele indivíduo que falhou ao buscar alimento.

1.5 COMPORTAMENTO SOCIAL

A unidade social primária da colônia de *D. rotundus* é o agrupamento de fêmeas. A organização social é do tipo hierarquia de dominância, com pequenos haréns onde um macho dominante se sobressai sobre um agrupamento de oito a doze fêmeas e seus filhotes (num total de até 50 indivíduos, geralmente), sendo que estas fêmeas e filhotes permanecem em constantes interações sociais e contato corporal (GREENHALL *et al.*, 1983; WILKINSON, 1990). As fêmeas, assim que nascem, são recrutadas pelo macho dominante e são responsáveis, quando adultas, por amamentar, proteger e ensinar seus próprios filhotes e também regurgitar sangue para outros membros da colônia (WILKINSON, 1985; KUNZ & PIERSON, 1994). No entanto, Wilkinson (1985) acredita que provavelmente os machos adultos competem principalmente pelo acesso e defesa do abrigo que já contém algumas fêmeas agrupadas, ao invés de forçar fêmeas para si.

Os filhotes machos, à medida que se tornem adultos, são expulsos do grupo pelo macho dominante, sendo obrigados a dispersar. Wilkinson (1984), na Costa Rica, observou que todos os machos que nasciam deixaram o grupo natal após completar um ano de idade. Os

machos solteiros formam pequenos agrupamentos que podem permanecer próximos do harém à espera de uma oportunidade de ocupar o posto de macho dominante. Podem, também, sair e ir procurar outros locais para constituir seu próprio harém. (WILKINSON, 1990; BREDT *et al.*, 1998). Embora as fêmeas dêem preferência aos machos de hierarquia superior, Wilkinson (1985) obteve uma média máxima de paternidade para o macho dominante de apenas 46%. Assim, o sucesso de acasalamento aleatório dos machos não-dominantes é fundamental para a variabilidade genética da espécie.

1.6 COMPORTAMENTO REPRODUTIVO

Na região Neotropical, o padrão reprodutivo dos morcegos é afetado principalmente pela sazonalidade de estação úmida e seca, já que esta influencia no suprimento alimentar. No caso do morcego-vampiro-comum, há um filhote por gestação sendo que os nascimentos não são sazonais, ocorrendo durante todo o ano (padrão poliétrico) (GREENHALL *et al.*, 1983; O'BRIEN, 1993), uma vez que a disponibilidade de alimento é constante em relação à sazonalidade (SCHMIDT, 1988). Entretanto, há picos de nascimentos em diferentes épocas do ano, com uma possível sincronia da atividade sexual nestes períodos. Na Costa Rica, Turner (1975) notou um grande número de fêmeas grávidas durante a estação chuvosa e discutiu a possível influência da situação hormonal da presa sendo influenciável ao ciclo sexual de *D. rotundus*.

A cópula ocorre quando o macho monta no dorso da fêmea imobilizando-a com a ajuda das asas e mordendo a pele do pescoço dela, totalizando cerca de dois minutos. O macho dominante da colônia copulará com um maior número de fêmeas de sua colônia, além de copular com algumas de colônias adjacentes. Já os não-dominantes acasalam oportunisticamente, durante a desatenção ou ausência do macho dominante. A gestação dura cerca de sete meses e os intervalos entre nascimentos são em média 350 dias (WILKINSON, 1985; SCHMIDT, 1988).

Comparado com outras espécies de morcegos, filhotes de morcegos-vampiros dependem da mãe por um longo tempo, principalmente quanto ao aleitamento. Embora os filhotes iniciem a ingestão de sangue regurgitado a partir dos 4 meses de idade, eles apenas desmamam aos 9 ou 10 meses de idade. Juvenis são alimentados não somente por sua mãe, mas podem ser também alimentado por outros membros da colônia, uma vez que costumam formar “creches” (SCHMIDT, 1988).

1.7 *D. ROTUNDUS* E A SAÚDE PÚBLICA

O morcego-vampiro-comum é associado a diversas enfermidades, como histoplasmoze, tripanossomoze eqüina (“mal das cadeiras”), encefalite eqüina, brucelose. Já o vírus rábico *Lyssavirus* sp., enfermidade infecciosa que afeta mamíferos, parece ter, nos morcegos hematófagos, o melhor e mais eficiente veículo de propagação. Uma vez que estes agredem diariamente outros animais (suas presas para se alimentar e/ou seus próprios companheiros, nas interações sociais agressivas). (CONSTANTINE, 1970; BREDT *et al.*, 1998; UIEDA & DEBERALDINI, 2002; GITTI, 2007)

Das espécies de morcegos, *D. rotundus* é a principal transmissora de raiva dos animais herbívoros da América Latina (ACHA & MÁLAGA-ALBA, 1988; BAER, 1991; GREENHALL *et al.*, 1983; UIEDA & DEBERALDINI, 2002), sendo considerado reservatório da doença (KOTAIT, 2002; CALISHER *et al.*, 2006). Contudo, morcegos não-hematófagos também podem transmitir raiva, bem como qualquer outro mamífero (SÃO PAULO, 2006). Isto se deve ao comportamento típico da espécie em possuir intenso contato físico entre os membros da por realizarem limpeza mútua e regurgitarem alimento para os outros indivíduos (TURNER, 1975 *apud* LINHART *et al.*, 1972). A presença de indivíduos não-residentes em uma colônia apesar de favorecer a variabilidade genética da população de morcegos, pode também ter um papel importante na propagação da raiva entre agrupamentos de *D. rotundus* (TURNER, 1975).

As metodologias de controle destes animais se dão, geralmente, no extermínio indiscriminado das colônias de morcegos que habitam locais próximos a criações de animais. No entanto, estas podem acometer também na matança de outras espécies de morcegos do local em questão, uma vez que várias espécies de quirópteros são gregários e coabitam um mesmo local, interagindo entre si (MAYEN, 2003). Dentre os métodos comumente utilizados estão: explosões do abrigo com o uso de dinamites (ARTECHE, 1969; CONSTANTINE, 1970), gás e pastas químicos venenosos (DUMITH-ARTEAGA *et al.*, 1967; ALMEIDA *et al.*, 2002) e redes com corrente elétrica (VILLA-R., 1969).

1.8 GENÉTICA

Ao estudarem o cariótipo de *D. rotundus*, Forman *et al.* (1968) e Baker (1970; 1973) descreveram que há um número diplóide de 28 cromossomos, sendo o número de braços autossômicos (NF) igual a 52. A maioria dos autossômicos é biarmado (não-acrocêntrico). Já

o cromossomo X é grande e submetacêntrico, enquanto que o Y é pequeno e acrocêntrico. Tal cariótipo é considerado derivado dentro da família e até mesmo de Desmodontinae (BAKER *et al.*, 1988).

Wilkinson (1985) utilizou marcadores moleculares (alozimas) e observações diretas de comportamento para quantificar e explicar a estruturação genética de *D. rotundus* na Costa Rica. Demonstrou que machos dominantes acasalam mais do que os outros machos. No entanto estes machos subordinados dispersam mais, contribuindo para a variabilidade genética da população. Quanto às fêmeas, embora haja filopatria, a aleatoriedade dos cruzamentos parece ser suficiente para causar heterogeneidade dentro da população.

Baker *et al.* (1988) analisaram 22 *loci* de alocimas em espécimes da América Central. Logo, encontraram baixos níveis de divergência entre colônias e entre indivíduos pertencentes a mesma colônia.

Santos *et al.* (2001) ao comparar o cariótipo de *D. rotundus* com o de outro morcego hematófago, *Diphylla ecaudata*, observou que o cromossomo sete do primeiro é correspondente ao oito no segundo. O bandeamento-C de Giemsa (CBG) revelou heterocromatina constitutiva na região pericentromérica em todos os cromossomos autossomos. Além disso, demonstrou correspondência no número e localização das regiões organizadoras nucleares (NORs) ao utilizar os métodos de AgN₃, CMA (cromomicina A₃) e FISH (fluorescência *in situ*)

Mais tarde, Ditchfield (2000) em floresta Atlântica encontrou haplótipos (N=7) altamente divergentes para o marcador molecular citocromo b em localidades relativamente próximas. Isto porque acreditava que haveria heterogeneidade na distribuição geográfica para esta espécie.

No entanto, tanto Baker *et al.* (1988) quanto Ditchfield (2000) possuíam uma amostragem restrita em número de localidades e de indivíduos. E embora esta espécie tenha um grande espectro de variabilidade morfológica ao longo da distribuição geográfica, nenhum estudo tinha analisado a variabilidade genética ao longo desta distribuição.

Logo, Martins *et al.* (2007) descreveu a filogeografia do morcego-vampiro-comum no território brasileiro, sendo quatro clados geograficamente distintos: 1) Mata Atlântica do Sul; 2) Mata Atlântica do Norte; 3) Pantanal; e 4) Amazônia e Cerrado. Com base em análises de sequências mitocondriais, a diferenciação entre estes clados é fortemente apoiada estatisticamente, embora as relações filogenéticas entre eles permanecessem incertas. Os níveis extremamente elevados de divergência entre as sequências encontradas entre os clados foram os mais altos descritos até aquele momento para morcegos neotropicais.

Martins *et al.* (2009) visou testar como o processo de vicariância ecológica gerado pelas glaciações do Pleistoceno influenciou na distribuição das linhagens intraespecíficas de *D. rotundus*. Utilizando uma sequência do DNA mitocondrial (mtDNA) e marcador de dois marcadores nucleares (RAG2 e DRB), os autores concluíram que há estruturação geográfica marcada por um marcador mitocondrial e nenhuma estruturação filogeográfica de marcadores nucleares. Isto, portanto, sendo compatível com um cenário histórico de isolamento completo das populações no refúgio, como durante o Pleistoceno. Os resultados da história demográfica sobre esta espécie, de acordo com os autores, são compatíveis com o modelo de Carnaval-Moritz de vicariância pleistocênica, com expansão demográfica na Mata Atlântica do Sul.

Piaggio *et al.* (2008) desenvolveu os marcadores moleculares para doze *loci* de microssatélites, permitindo uma nova abordagem principalmente em nível intraespecífico. Além disso, testaram a possibilidade de alelos nulos e a probabilidade de desequilíbrio de ligação entre os *loci*.

Miguel Pinto (2009) realizou coletas em diferentes altitudes (251 a 2142 metros) ao sul do Equador a fim de verificar a ausência ou presença de fluxo gênico entre populações de *D. rotundus*. Assim, observou alta estruturação do mtDNA (gene: citocromo B) nas populações de lados opostos da Cordilheira dos Andes. Quanto ao DNA nuclear (gene: B-beta-poli-peptídeo), foi observado baixa estruturação dentre estas populações, devido à dispersão assimétrica entre machos e fêmeas.

2 JUSTIFICATIVA

Mesmo considerada uma espécie abundante e de ampla distribuição geográfica na região Neotropical, *Desmodus rotundus* sofre constantes pressões de extermínio de suas colônias, o que pode futuramente prejudicar a sobrevivência e existência da espécie. Além disso, as técnicas utilizadas para tanto acarretam, muitas vezes, na mortalidade de outras espécies de morcegos cuja importância ecológica é indiscutível.

O morcego-vampiro-comum há muitos anos desperta a curiosidade e interesse dos pesquisadores principalmente devido aos prejuízos econômicos causados, ao hábito alimentar peculiar e importância na disseminação do vírus rábico. No entanto, dados sobre a Genética Molecular da espécie ainda estão sendo obtidos paulatinamente.

3 OBJETIVO

(1) Revisar as características gerais, ecologia, comportamento alimentar e reprodutivo de *D. rotundus* já descritos na literatura, além da sua importância na agroeconomia e saúde pública.

(2) Salientar a lacuna ainda existente no que tange à Ecologia Molecular para a espécie.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; MALÁGA-ALBA, M. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: **Natural history of vampire bats**. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 207-214, 1988.
- AGUIAR, L. M. S. Subfamília Desmodontinae. In: **Morcegos do Brasil**. REIS, N. R. dos; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Org.). Londrina: UEL/SEMA, p. 37-44, 2007.
- ALMEIDA, E. O.; MOREIRA, E. C.; NAVEDA, L. A. B.; HERRMANN, G. P. Combat of *Desmodus rotundus rotundus* (E. Geoffroy, 1810) in the Cordisburgo and Curvelo carstic region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 54, p.117-126, 2002.
- ALTENBACH, J. S. Locomotion. In: **Natural history of vampire bats**. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 71-83, 1988.
- ARITA, H. Rarity in Neotropical bats: correlations with phylogeny, diet, and body mass. **Ecological Applications**. v. 3, n. 3, p. 506-517, 1993.
- ARTECHE, E. A. Rabia en Rio Grande do Sul. **Zoonosis**. v. 11, p. 34-35, 1969.
- BAER, G. M. **The natural History of Rabies**. Florida: CRC Press, 2 ed., 620 f., 1991.
- BAKER, R. J. Karyotypic trends in bats. In: **Biology of bats**, WIMSATT, W. A. (Ed). New York: Academic Press. p. 1-406, 1970
- ____ Comparative cytogenetics of the New World leaf-nosed bats (Phyllostomidae). **Periodicum Biologum**. v. 75, p. 37-45, 1973.
- BAKER, R. J.; HONEYCUTT, R. L.; BASS, R. A. Genetics. In: **Natural History of Vampire Bats**, GREENHALL, A. M. & SCHMIDT, U. (Eds). Florida: CRC Press, p. 31-40, 1988.

BERNARD, E. Morcegos vampiros: sangue, raiva e preconceito. **Ciência Hoje**. v. 36, n. 214, p. 44-49, 2005.

BREDT, A. **Morcegos em áreas urbanas e rurais**: Manual de Manejo e Controle. Brasília, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 117 f., 1998.

BREDT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira Zoologia**. v. 16, n. 3, p. 731-770, 1999.

CALISHER, C. H.; CHILDS, J. E.; FIELD, H. E.; HOLMES, K. V.; SCHOUNTZ, T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 3, p. 531-545, 2006.

CARTWRIGHT, T. The plasminogen activator of vampire bat saliva. **Blood**. v. 43, p. 317-326, 1974.

CONSTANTINE, D. G. Bats in relation to the health, welfare, and economy of man. *In*: **Biology of bats**. WIMSATT, W. A. (Ed.), New York: Academic Press, v. 2, p. 320-468, 1970.

____. Transmission of pathogenic microorganisms by vampire bats. *In*: **Natural history of vampire bats**. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 167-189, 1988.

CRESPO J. A. Ecología de la comunidad de mamíferos del Parque Nacional Iguazu, Misiones. **Revista del Museo Argentino Ciencias Naturales ‘Bernardino Rivadavia’**: Ecologia. v. 3, n. 45, p. 48-162, 1982.

CRESPO, J. A.; VANELLA, J. M.; BLOOD, B. J.; DE CARLO, J. M. Observaciones ecologicas del vampiro *Desmodus r. rotundus* (E. Geoffroy) en el norte de Córdoba. **Revista del Museo Argentino Ciencias Naturales ‘Bernardino Rivadavia’**. Ecologia. v. 6, p. 131-160, 1961.

CRESPO, R. F.; BURNS, R. J.; LINHART, S. B. Comportamiento del vampire (*Desmodus rotundus*) durante su alimentacion en Ganado bovino en cautiveiro. **Tecnica Pecuaria en Mexico**. v. 18, p. 40-44, 1971.

- CRESPO, R. F.; LINHART, S. B.; BURNS, R. J.; MITCHELL, G. C. Foraging behavior of the common Vampire bat related to moonlight. **Journal of Mammalogy**. v. 53, n. 2, p. 366-368, 1972.
- DALQUEST, W. W. Natural History of the Vampire Bats of Eastern Mexico. **American Midland Naturalist**. v. 53, n. 1, p. 79-87, 1955.
- DELPIETRO, H.A., MARCHEVSKY, N.; SIMONETTI, E. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 14, p. 13-20, 1992.
- DiSANTO, P. E. Anatomy and histochemistry of the salivary glands of the vampire bat, *Desmodus rotundus murinus*. **Journal of Morphology**. v. 106, p. 301-335, 1960.
- DITCHFIELD, A. D. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraespecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. **Molecular Ecology**. v. 9, p. 1307-1318, 2000.
- DITMARS, R. L.; GREENHALL, A. M. The Vampire Bat: a presentation of undescribed habits and review of this history. **Zoologica**. v. 19, n. 3, p. 53-76, 1935.
- DUMITH-ARTEAGA, G.; LOPEZ, H. A.; ROSALES, H. G. Cuestionario sobre rabies: Informe de la situacion de Venezuela. In: **1º Seminario Internacional del Rabies na America**. Venezuela, p. 416-429, 1967.
- ESBÉRARD, C. E. L. Morcegos aprendem a evitar redes. In: **Caderno de Resumos do XXVI CBZ**, 2002.
- ESBÉRARD, C. E. L. Influência do ciclo lunar na captura de morcegos Phyllostomidae. **Iheringia, Série Zoologia**. v. 97, n. 1, p. 81-85, 2007.
- FLEMING, T. H.; HOOPER, E. T.; WILSON, DON E. Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles, and movement patterns. **Ecology**. v. 53, n. 4, p. 555-569, 1972.
- FORMAN, G. L.; BAKER, R. J.; GERBER, J. D. Comments of the systematic status of vampire bats (family Desmodontidae). **Systematic Zoology**. v.17, p. 417-425, 1968

FREITAS, M. B. D. 2000. **Metabolismo do morcego hematófago *Desmodus rotundus***. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2000.

GARDNER, A. L. Feeding Habits. **Special Publications of Museum Texas Tech University**. v. 13, p. 293-350, 1977.

GITTI, C. B. Doenças transmitidas ou relacionadas aos morcegos. *In: Curso sobre controle da raiva silvestre (*D. rotundus*) no Brasil*. SOUZA, J. C. P.; GITTI, C. B. & NOGUEIRA FILHO, V. D. (Orgs). Rio de Janeiro, Convênio MAPA/PANAFTOSA-OPAS/OMS, p. 35-40, 2007.

GOHLKE, M.; BAUDE, G.; NUCK, R.; GRUNOW, R.; KANNICHT, C.; BRINGMANN, P.; DONNER, P.; REUTTER, W. O-Linked _L-Fucose is present in *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, n. 13 (29), p. 7381-7386, 1996.

GOMES, M. N.; UIEDA, W. Diurnal roosts, colony composition, sexual size dimorphism and reproduction of the common vampire bat *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy) (Chiroptera, Phyllostomidae) from State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Revista Brasileira Zoologia**. v. 31, n. 3, p. 629-638, 2004.

GONZALEZ, R.; MITCHELL, G. C. Vampire bat control programs in Latin America. **Proceedings of the 7th Vertebrate Pest Conference** Vertebrate Pest Conference Proceedings collection, p. 254-257, 1976.

GREENHALL, A. M. Notes on behavior of captive vampire bats. **Mammalia**. v. 29, n. 4, p. 441-451, 1965.

_____. The use of a precipitin test to determine host preferences of the vampire bats, *Desmodus rotundus* and *Diaemus youngi*. **Bijdragen Tot de Dierkunde**: Proceedings of the 2nd International Bat Research Conference. v. 40, n. 1, p. 74-76, 1970.

_____. The biting and feeding habits of the vampire bat, *Desmodus rotundus*. **Journal of Zoology**. v. 168, p. 451-461, 1972.

_____. Vampire bat control in the Americas: A review and proposed program for action. **Bulletin of the Pan American Health Organization**. v. 8, n. 1, p. 30-35, 1974.

_____. Feeding behavior. *In: Natural history of vampire bats*. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 111-131, 1988.

GREENHALL, A. M.; JOERMANN, G.; SCHMIDT, U. *Desmodus rotundus*, Vampire Bat. **Mammalian Species**. n. 202, p. 1-6, 1983.

GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U.; LOPEZ-FORMENT, W. The attacking behavior of the vampire bat, *Desmodus rotundus*, under field conditions. **Biotropica**. v. 3, n. 2, p. 136-141, 1971.

HAWKREY, C. M. Plasminogen activator in saliva of the vampire bat, *Desmodus rotundus*. **Nature**. v. 211, p. 434-435, 1966.

_____. Inhibitor of platelet aggregation present in saliva of the vampire bat *Desmodus rotundus*. **British Journal of Haematology**. v. 13, p. 1014-1020, 1967.

KALKO, I. Manejo de quirópteros em áreas urbanas. *In: Manual Técnico do Instituto Pasteur*. KALKO, I. *et al.* (Orgs.). São Paulo: Instituto Pasteur de São Paulo. n. 7, p. 1, 1998.

KOTAIT, I. Raiva em morcegos no Brasil. **Anais do IV Encontro Brasileiro para o Estudo de Quirópteros (EBEQ)**. p. 28-29, 2002.

KUNZ, T. H. & FENTON, M. B. **Bat Ecology**. Chicago and London, The University of Chicago Press, ed. reimp, 779 f., 2005.

KUNZ, T. H. & PIERSON, E. D. *In: Walker's bats of the world*. NOWAK, R. M.. Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press, 287 f., 1994.

LAVAL, R. K. Banding returns and activity periods of some Costa Rican bats. **SouthWestern Naturalist**. v. 15, n. 1, p. 1-10, 1970.

LINHART, S. B.; CRESPO, R. F.; MITCHELL, G. C. Control del murciélagos vampiros por medio de un anticoagulante. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana**. v. 73, n. 2, p. 100-109, 1972.

MARINHO-FILHO, J. S.; SAZIMA, I. Activity patterns of six phyllostomid bat species in southeastern Brazil. **Revista Brasileira Biologia**. v. 49., n. 3, p. 777-782, 1989.

MARTINS, F. M.; DITCHFIELD, A. D.; MEYER, D.; MORGANTE, J. S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus*

rotundus (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolution Research**. v. 45, n. 4, p. 372-378, 2007.

MARTINS, F. M.; TEMPLETON, A. R.; PAVAN, A. C. O.; KOHLBACH, B. C.; MORGANTE, J. S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**. v. 9, p. 294, 2009.

MAYEN, F. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of Veterinary Medicine Series B**. v. 50, p. 469-472, 2003.

McFARLAND, W. N.; WIMSATT, W. A. Renal function and its relation to the ecology of the Vampire Bat, *Desmodus rotundus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 28, p. 985-1006, 1969.

MCNAB, B. K. Energetics and the distribution of vampires. **Journal of Mammalogy**. v. 54, n. 1, p. 131-144, 1973.

MIGUEL PINTO, L. C. **Genetic diversity of the common vampire bat *D. rotundus* in Ecuador: testing cross-andean gene flow**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Biologia) – Texas Tech University, Texas, 2009.

MIRANDA, J. M. D.; BERNARDI, I. P.; PASSOS, F.C. A new species of *Eptesicus* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) from the Atlantic Forest, Brazil. **Zootaxa**. v. 1383, p. 57-68, 2006.

MITCHELL, G. C.; CRESPO, R. F.; BURNS, R. J.; SAID, F. S. Vampire bats: rabies transmission and livestock production in Latin America. **Denver Wildlife Research Center**. Series of Annual Reports from 1969 through 1975, Denver: U. S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 30 f., 1972.

MITCHELL, G. C.; BURNS, R. J. **Chemical control of Vampire Bats**. Denver: U. S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 1973.

O' BRIEN, G. M. Seasonal reproduction in flying foxes, review in the context of other tropical mammals. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 5, p. 499-521, 1993.

REIS, N. R.; SHIBATTA, O. A.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Sobre os morcegos brasileiros. *In: Morcegos do Brasil*. REIS, N. R. dos; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Org.). Londrina: UEL/SEMA, p. 17-25; 219-223, 2007.

RISKIN, D. K.; HERMANSON, J. W. Independent evolution of running in vampire bats **Nature**. v. 434, p. 292, 2005.

RISKIN, D. K.; PARSONS, S.; SCHUTT JR., W. A.; CARTER, G. G.; HERMANSON, J. W. Terrestrial locomotion of the New Zealand short-tailed bat *Mystacina tuberculata* and the common vampire bat *Desmodus rotundus*. **The Journal of Experimental Biology**. v. 209, n. 9, p. 1725-1736, 2006.

SANTOS, N., FAGUNDES, V., YONENAGA-YASSUDA, Y. AND SOUZA, M. J. 2001. Comparative karyology of Brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribosomal genes. **Hereditas**. v. 134, p. 189-194, 2001.

SÃO PAULO. INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. **Boletim Epidemiológico Paulista**: Publicação mensal sobre agravos à Saúde Pública. v. 3, n. 36, p. 9-13, 2006.

SAZIMA, I. Aspectos do comportamento alimentar do morcego hematófago, *Desmodus rotundus*. **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**. v. 3, p. 97-119, 1978.

SCHMIDT, U. Reproduction. *In: Natural history of vampire bats*. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 99-110, 1988.

SCHMIDT, U.; SCHLEGEL, P. SCHWEIZER, H.; NEUWEILLER, G. Audition in vampire bats, *Desmodus rotundus*. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology**. v. 168, n. 1, p. 45-51, 1991.

SCHMIDT, U. Vampirfledermäuse - Familie Desmodontinae (Chiroptera). **Die Neue Brehm Bücherei**. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1995.

SCHNEIDER, M. C.; ARON, J.; SANTOS-BURGOA, C.; UIEDA, W.; RUIZ-VELAZCO, S. Common vampire bat attacks on humans in a village of the Amazon region of Brazil **Cadernos de Saúde Pública**. v. 17, n. 6, p. 1531-1536, 2001.

TADDEI, V. A. Sistemática de quirópteros. Sistemática de Quirópteros. **Boletim do Instituto Pasteur**. v. 1, n. 2, p. 3-15, 1996.

TADDEI, V. A.; Gonçalves, C. A.; Pedro, W. A. **Distribuição do morcego vampiro *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos**. Campinas: Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 107 f., 1991.

TRAJANO, E. **Padrões de distribuição e movimentos de morcegos cavernícolas no Vale do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo**. 187 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981.

TRAPIDO, H. Observations on the Vampire Bat with special reference to longevity in captivity. **Journal of Mammalogy**. v. 27, n. 3, 1946.

TURNER, D. C. **The Vampire Bat: a field study in behavior and ecology**. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 145 f., 1975.

UEDA, W. **Aspectos do comportamento alimentar das três espécies de morcegos hematófagos (Chiroptera, Phyllostomidae)**. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1982.

_____. Morcegos hematófagos e a raiva dos herbívoros no Brasil. *In: Anais do Seminário de Ciências da Faculdades Integradas de Uberaba (FIUBE)*. p. 13-29, 1987.

_____. **Comportamento alimentar de morcegos hematófagos ao atacar aves, caprinos e suínos, em condições de cativeiro**. 187 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

UEDA, W.; DEBERALDINI, E. R. Papel do morcego hematófago *Desmodus rotundus* na transmissão da raiva. Porto Alegre, **Anais do IV Encontro Brasileiro para o Estudo de Quirópteros (EBEQ)**. v. 4, p. 32-36, 2002.

UEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOMES, L. M.; SILVA, M. M. S.. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**. v. 2, n. 1, p. 17-36, 1996

VILLA-R., B. **Los murciélagos de Mexico**. Instituto de Biología, Universidad Nacional de México, 492 f., 1966.

_____. Ethology and ecology of vampire bats. **International Union for the Conservation of Nature Publications**. v. 13, p. 104-110, 1968.

_____. The Ecology and Biology of Vampire Bat and their relationship to Paralytic Rabies. *In: Report to the Government of Brazil: United Natural Development Programme/Food Agr. Org. (FAO) U. N.*, n. TA2656, p. 1-8, 1969.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. Chave para a identificação de quirópteros brasileiros. **Boletim de Ciências, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras**. São José do Rio Preto, 73 f., 1973.

WEIGL, R. **Longevity of Mammals in captivity; from the living collections of the world: a list of mammalian longevity in captivity.**[Kleine Senckenberg-Reihe 48]. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele und Obermiller), Stuttgart, 214 f. 2005.

WILKINSON, G. S. The social organization of the common vampire bat. II. Mating system, genetic structure, and relatedness. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 17, p. 123-134, 1985.

WILKINSON, G. S. Food sharing in vampire bats. **Scientific American**. v. 262, n. 2, p. 64-70, 1990.

WIMSATT, W. A. Responses of captive common vampires to cold and warm environments. **Journal of Mammalogy**. v. 43, n. 2, p. 185-191, 1962.

_____. Transient behavior, nocturnal activity patterns and feeding efficiency of vampire bat (*Desmodus rotundus*) under natural conditions. **Journal of Mammalogy**. v. 50, n. 2, p. 233-244, 1969.

WIMSATT, W. A.; GUERRIERE, A. Observations on the feeding capacities and excretory functions of captive vampire bats. **Journal of Mammalogy**. v. 43, n. 1, p. 17-27, 1962.

Capítulo 2: Estrutura da população de *Desmodus rotundus* no Conjunto Fada-Jesuítas do
Parque Estadual de Campinhos.

SUMÁRIO

Resumo	30
ABSTRACT	31
1 INTRODUÇÃO	32
1.1 A FAUNA CAVERNÍCOLA	32
1.1.1 A QUIROPTEROFAUNA CAVERNÍCOLA.....	32
1.2 PADRÃO DE ATIVIDADE EM MORCEGOS	33
1.3 ESTIMATIVA DE TAMANHO DA POPULAÇÃO EM MORCEGOS (<i>N</i>)	33
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 ÁREA DE ESTUDO	39
4.2 METODOLOGIA APLICADA	41
4.2.1 SESSÕES DE CAPTURA.....	41
4.3 MÉTODOS DE ESTIMATIVA DE TAMANHO POPULACIONAL	42
4.4 ANÁLISE DOS DADOS ECOLÓGICOS.....	44
5 RESULTADOS	45
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO.....	58
Referências	59

RESUMO

Do ponto de vista biológico, as cavernas são para os morcegos importantes abrigos, uma vez que são ambientes estáveis que permitem a interação social e a proteção contra intempéries, diminuem o risco de predação e promovem a conservação de energia. No Brasil, *Desmodus rotundus* é a principal espécie encontrada nesses ambientes. Conhecido como morcego-vampiro-comum, *D. rotundus* é a espécie de morcego cuja biologia é mais bem conhecida já que causa prejuízos à agroeconomia e saúde pública. Este estudo oferece informações sobre a estrutura da população de *Desmodus rotundus* no Parque Estadual de Campinhos (PEC) (25°02'S, 49°05'W, 890 m de altitude, 580 ha). Foram realizadas 14 fases de campo entre o período de junho de 2007 a maio de 2008 e junho de 2009 a março de 2010. Utilizou-se seis redes de neblina armadas rentes ao solo, durante nove a doze horas de período noturno, nas entradas e proximidades da Gruta dos Jesuítas e Gruta da Fada e possíveis corredores de vôo, num esforço de coleta totalizando 300h/noite/rede. Foram capturados 199 espécimes, sendo 142 machos. A captura de 57 fêmeas pode ter sido causada pelo fato de que as fêmeas e filhotes costumam manter-se nos abrigos, em agrupamentos chamados de “creches”. Foram capturados espécimes em todos os meses, inclusive em baixas temperaturas. Indivíduos jovens foram encontrados durante todo o ano, bem como aqueles ativos sexualmente, não havendo estação reprodutiva bem definida. A taxa de recaptura de 30% demonstrou fidelidade pelo abrigo e locais de forrageio. O padrão de atividade de forrageio se deu por um pico de atividade na primeira hora da noite (saída do abrigo), outros na sexta e oitava hora e um último ao amanhecer (retorno ao abrigo). Além disso, foram observados movimentos locais entre as cavernas amostradas. Assim, enfatiza-se a importância de se evitar a ação antrópica excessiva nestas cavernas e a conservação do remanescente florestal, além de incentivar a realização de estudos em fitofisionomias distintas.

Palavras-chave: Morcego-vampiro-comum. Caverna. Padrão de atividade. Censo.

ABSTRACT

From a biological point of view, the caves are important shelters for bats, since they are stable environments that allow social interaction and weather resistance, decreases the risk of predation and promote energy conservation. In Brazil, *Desmodus rotundus* is the major species found in these environments. Called as common vampire bat, *D. rotundus* is the bat species whose biology is better known because it causes damage to agricultural economic and public health. This study provides information on the population structure of *Desmodus rotundus* in Campinhos State Park (PEC) (25 ° 02' S, 49 ° 05' W, 890 meters of altitude, 580 ha). Were carried out 14 field phases between the period June 2007 to May 2008 and June 2009 to March 2010. We used six mist-nets armed close to the ground for nine to twelve hours of the evening at entrances and near the Cave of the Jesuits and the Fairy Cave and possible flight corridors in an effort to collect a total 300h/night/net. We collected 199 specimens, 142 males. The capture of 57 females may have been caused by the fact that females and juveniles tend to remain in shelters in groups called "crèches". Specimens were caught in all months, even at low temperatures. Juveniles were found throughout the year, and those sexually active, there is no well defined breeding season. The recapture rate of 30% demonstrated loyalty for shelter and foraging sites. The pattern of feeding activity was characterized by a peak of activity in the first hour of the night (leaving the shelter), others in the sixth and eighth hour in the evening and last one (return to shelter). Furthermore, local movements were observed between the sampled caves. Thus, we emphasize the importance of avoiding excessive anthropogenic activities in these caves and the preservation of remaining Forest, in addition encourage studies in differentn vegetation types.

Keywords: Common-vampire-bat. Cave. Activity pattern. Census.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FAUNA CAVERNÍCOLA

As cavernas constituem um ambiente único, com peculiaridades físicas, biológicas e importantes relações históricas e culturais (SESSEGOLO *et al.*, 2006). As cavidades naturais são elementos particulares da paisagem que ocorrem associados a um relevo singular, denominado relevo cárstico. Neste relevo são encontrados sumidouros e ressurgências, sendo que o primeiro refere-se ao local onde a drenagem superficial adentra em uma cavidade natural subterrânea. Já a ressurgência é onde a drenagem emerge de seu percurso subterrâneo e volta a ser superficial (SESSEGOLO *et al.*, 2006).

Do ponto de vista biológico, as cavernas representam um ambiente extremamente singular quando comparado com o meio externo, como ausência de luz nas regiões mais afastadas da entrada, temperatura constante (cerca de 20°C), umidade relativa do ar geralmente superior a 80%. Grande parte da energia provém do meio externo e é importada pelos morcegos e outros animais, que se alimentam fora da caverna e defecam dentro; ou é trazida através de aberturas para o meio externo, como rios, entradas, clarabóias e dolinas. (SESSEGOLO *et al.*, 2006)

A sinopse da fauna cavernícola brasileira revelou um grande número de táxons pertencentes a vários grupos, sendo 537 invertebrados e 76 vertebrados, além de algumas espécies de fungos (PINTO-DA-ROCHA, 1994, 1995). No entanto a maioria dos estudos esteve concentrada no Vale do Ribeira (TRAJANO, 2000).

Ações que modifiquem o ambiente cavernícola ou seu entorno (como obras de engenharia, mineração, deposição de resíduos e/ou efluentes, desmatamento) podem comprometer a conservação das espécies associadas às cavidades naturais subterrâneas (SESSEGOLO *et al.*, 1996).

1.1.1 A QUIROPTEROFAUNA CAVERNÍCOLA

Como descreveu Trajano (1995), na maioria das vezes as pessoas associam as cavernas como um local escuro, sinistro, com estalactites e estalagmites e repleto de morcegos. As cavernas são importantes abrigos para morcegos, uma vez que são ambientes estáveis, permitem a interação social e a proteção contra intempéries, diminuem o risco de predação e promovem a conservação de energia (KUNZ, 1982; KUNZ & PIERSON, 1994; KUNZ

& FENTON, 2005). Várias guildas de morcegos habitam as cavernas, principalmente os hematófagos, nectarívoros, carnívoros e insetívoros. Mesmo os morcegos que comumente não habitam a caverna costumam utilizá-la como abrigo durante os meses mais quentes (DALQUEST, 1955).

No Brasil, pelo menos 35 espécies de morcegos já foram encontradas em cavernas (CAMPANHÃ & FOLWER, 1993; TRAJANO, 1995), sendo que apenas sete delas foram registradas no Estado do Paraná (PINTO-DA-ROCHA, 1995; OLIVEIRA & SIPINSKI, 2001).

O morcego-vampiro-comum (*Desmodus rotundus*) é a espécie com maior número de registros cavernícolas (TRAJANO, 1995). No entanto a ameaça do extermínio desse morcego devido aos seus prejuízos à agroeconomia e à saúde pública, somada aos impactos humanos diretos e indiretos (turismo excessivo, poluição, diminuição da cobertura vegetal do entorno etc) acarreta, também, numa ameaça às outras espécies de morcegos que coabitam este abrigo, bem como a outros vertebrados e invertebrados.

1.2 PADRÃO DE ATIVIDADE EM MORCEGOS

A maneira pela qual os morcegos no Brasil utilizam o tempo para reprodução, busca por recursos e interações sociais foi alvo de estudo de vários autores (MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1989; PEDRO & TADDEI, 2002; AGUIAR *et al.*, 2004). Diferenças no padrão de forrageio permitem aos morcegos ocuparem diversos nichos em tempo distintos, minimizando a competição interespecífica pelos recursos (REIS, 1984; MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1989).

Além do tempo, o padrão de atividade também é reflexo de como o animal deve estar utilizando o meio, assim como está aproveitando dos recursos e de como está se comportando de acordo com as condições climáticas (MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1989). Sendo que para Turner (1975), o padrão de forrageio de *D. rotundus* é influenciado principalmente pela atividade da presa, e menos pela pressão exercida pelo predador.

1.3 ESTIMATIVA DE TAMANHO DA POPULAÇÃO EM MORCEGOS (N)

Em Ecologia de populações e comunidades uma variável importante que deve ser avaliada é o tamanho de população. Uma maneira de fazer isso é usar métodos de marcação-recaptura. Dentre as metodologias para estimar o tamanho da população em morcegos, esta é

técnica que proporciona melhores resultados quando se trata de grandes períodos de amostragem (THOMAS & LAVAL, 1988). Isto porque a estimativa utiliza informações sobre o número de animais marcados e sua proporção em amostras subsequentes. Sendo que há dois tipos gerais de populações: abertas ou fechadas (SEBER, 1982).

Todo modelo de marcação-recaptura é baseado nas seguintes premissas: 1) o animal marcado deve ter a mesma taxa de sobrevivência do animal não-marcado; 2) uma vez liberados, os animais marcados devem interagir aleatoriamente dentro da população estudada; 3) a marcação deve perdurar durante toda a amostragem; 4) animais marcados não podem ser menos ou mais capturados que animais não-marcados; 5) alguns modelos tratam de populações abertas ou fechadas, havendo inclusão ou exclusão de dados de nascimento, morte e migração durante o período amostrado (THOMAS & LAVAL, 1988; KREBS, 1999).

Populações fechadas são aquelas onde o efeito de nascimentos, mortalidade e migração não são considerados, ou seja, o tamanho da população no período amostrado é constante, embora a amostragem tenha que ser realizada num curto período de tempo (Comack, 1992). Quando apenas um período de marcação e recaptura é avaliado, o método de Petersen é o mais apropriado. Já quando várias amostras são tomadas com marcação e recaptura, tanto o método de Schnabel quanto o de Schumacher-Eschmeyer podem ser utilizados (KREBS, 1999).

Já as populações abertas são aquelas que durante o período amostrado, há alterações no tamanho e na composição da população por ocorrência de nascimento, morte ou migração (Schwarz & Arnason, 1996). Para tanto, o método de Jolly-Seber é o mais adequado (KREBS, 1999).

A marcação de alguns indivíduos de uma população permite a obtenção de dados de uma amostra da população real, gerando informações sobre movimentos, sobrevivência, fecundidade, taxa de crescimento (KEEN, 1988). No entanto, dificilmente um modelo irá representar fielmente a capturabilidade de indivíduos marcados e não marcados, e inexistem testes estatísticos suficientemente sensíveis para detectar tais desvios (THOMAS & LAVAL, 1988).

Para *Desmodus rotundus*, Turner (1975) desenvolveu um método indireto de estimativa de tamanho de população baseado principalmente em estudos anteriores de Dalquest (1955), Greenhall (1965) e Greenhall, Schmidt & Lopez-Forment (1971). Para este método, levou em consideração o número de animais de criação mordidos por noite, número de morcegos-vampiros que se alimentaram de animais de criação por noite, intervalo de dias entre as mordidas e número de vezes que cada morcego forrageia por noite.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de ter sido alvo de diversos estudos ecológicos e comportamentais no Brasil e no restante do neotrópico, o morcego-vampiro-comum (*Desmodus rotundus*) ainda apresenta uma estruturação da população e tamanho dos agrupamentos inconstante. Isto muito devido às influências ambientais, como a disponibilidade de recursos (principalmente de abrigos e alimento) e temperatura. Além disso, há poucos estudos acerca destes incisos para o Estado do Paraná.

O padrão de atividade de forrageio da espécie, apesar de ter sido estudado por vários autores, tem influências sob diversos fatores, como a localização e disponibilidade dos recursos, condições climáticas e pela atividade da presa.

3 OBJETIVOS

(1) Descrever a condição reprodutiva e ontogenética dos espécimes de *Desmodus rotundus* no Parque Estadual de Campinhos, bem como o padrão de atividade de forrageio.

(2) Estimar o tamanho da população (N) de *D. rotundus* com base em métodos de marcação-recaptura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

Para a escolha do local de estudo, a partir do proposto por Turner (1975), foram considerados principalmente: a presença e a relativa abundância de presas de criação (gado, porco, cavalo, galinha, etc) nas proximidades; presença e a relativa abundância de *D. rotundus*; e a presença de remanescentes florestais com potenciais hospedeiros selvagens. Além disso, Arnone & Passos (2007) capturaram 274 indivíduos de *D. rotundus*, correspondendo a mais de 64% das capturas para a área de estudo, o Parque Estadual de Campinhos – PR.

As coletas foram realizadas no Parque Estadual de Campinhos (PEC) (25°02' S e 49°05' W) (**Figura 1**) localizado às margens da Estrada da Ribeira, entre os municípios de Tunas do Paraná e Cerro Azul, Paraná, Brasil. Possui cerca de 580 hectares e 890 metros de altitude e temperatura média anual entre 16°C e 18°C (PARANÁ, 2003). Este parque foi considerado Unidade de Conservação através do decreto estadual nº 31.013 de 20 de julho de 1960, a fim de proteger o complexo de grutas (Conjunto Fada/Jesuítas) de 1527 metros de desenvolvimento e o remanescente de Floresta com Araucária.

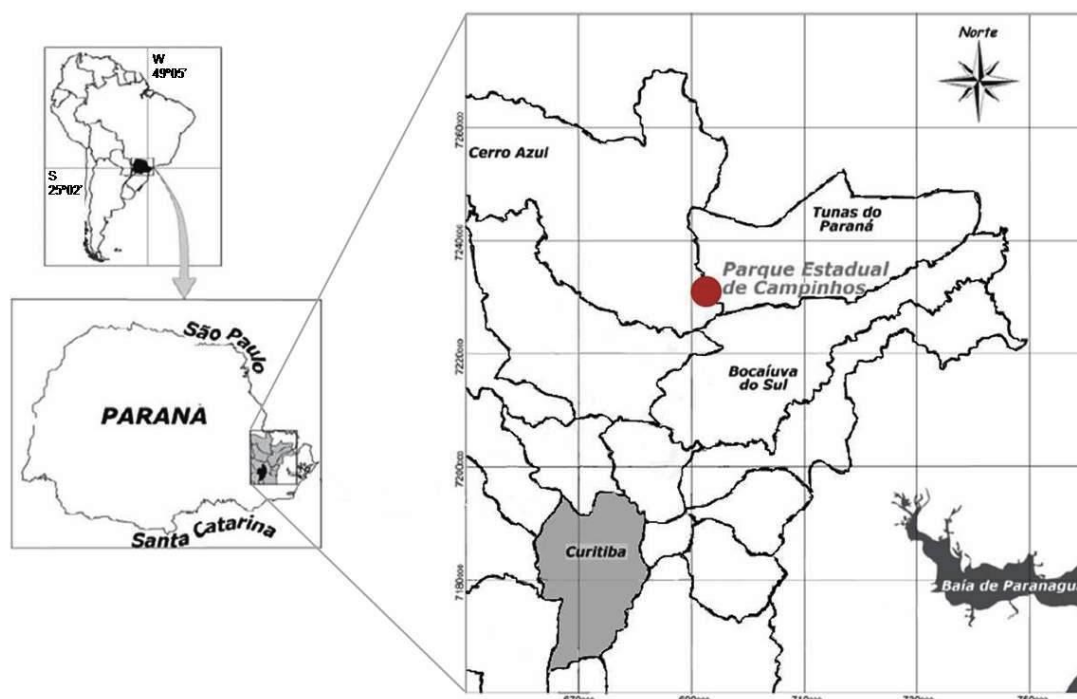


FIGURA 1: MAPA DA LOCALIZAÇÃO DO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS (PEC). Situado na região do Vale do Ribeira, entre os municípios de Tunas do Paraná e Cerro Azul, a 63 km da capital paranaense, Curitiba.

Adaptado de ARNONE & PASSOS (2007).

No PEC a Gruta da Fada e a Gruta do Abismo Professor Scheibler são consideradas a porção superior do sistema cárstico. Este nível encontra-se interrompido pela Dolina da Fada e visualmente observa-se a equivalência de nivelação entre estas grutas, encontrando-se dispostos em um mesmo direcionamento e em sentidos opostos (PARANÁ, 2003). Isto porque, no passado, houve um desabamento do teto da porção superior-esquerda da Gruta dos Jesuítas, formando uma dolina de colapso e isolando assim a Gruta da Fada do Complexo Fada-Jesuítas (**Figura 2**).

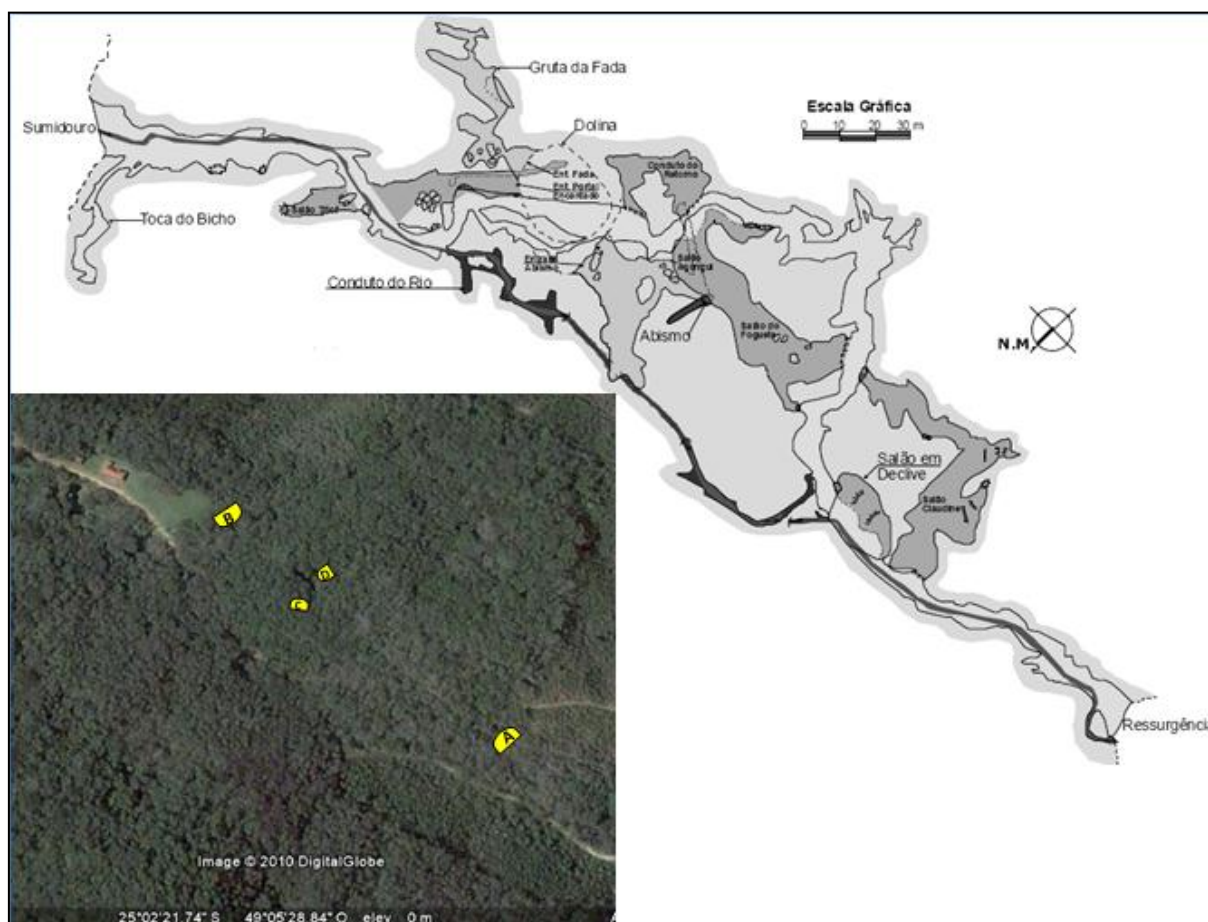


FIGURA 2: COMPLEXO DE GRUTAS DO PEC: CONJUNTO FADA-JESUÍTAS. Mapa topográfico do Conjunto Fada-Jesuítas, sendo que cada coloração representa um mesmo nível de carstificação. Foto aérea do Conjunto Fada-Jesuítas composto por: **A)** Ressurgência da Gruta dos Jesuítas; **B)** Sumidouro da Gruta dos Jesuítas; **C)** Gruta Abismo Professor Schiebler; e **D)** Gruta da Fada. Adaptado de PARANÁ (2003) e GOOGLE EARTH (2010).

O clima da região é subtropical úmido mesotérmico de verões frescos, inverno com geadas frequentes e sem estação seca, do tipo Cfb na classificação de Köppen. Além de temperatura média anual entre 16°C e 18°C, sendo a temperatura média do mês mais quente de 21°C e a do mês mais frio 13°C (PARANÁ, 2003).

Segundo Klein (1962) o PEC situa-se em região onde originalmente ocorria a Floresta Ombrófila Mista Montana com núcleos de campos. Sendo, atualmente, um ambiente alterado em regeneração, a cobertura vegetal do parque é composta por fragmentos de Floresta Ombrófila Mista em vários estágios de sucessão e por povoamento de *Pinus* sp. e outras espécies vegetais exóticas (PARANÁ, 2003). Por se tratar de uma Unidade de Conservação, atualmente estão sendo gradativamente retiradas as espécies exóticas do local.

4.2 METODOLOGIA APLICADA

4.2.1 SESSÕES DE CAPTURA

Foram realizadas 14 fases de campo entre o período de junho de 2007 a maio de 2008 e junho de 2009 a março de 2010. Restringiu-se às noites com baixa luminosidade, como as de lua nova ou minguante, para maximizar as capturas (CRESPO *et al.*, 1972; CARDOSO *et al.*, 1996; ESBÉRARD, 2007). Foram colocadas seis redes de neblina (*mist-nets*) (GREENHALL & PARADISO, 1968), sendo que no primeiro período de fase de campo (2007-2008) as redes de neblina eram abertas das 21h00 ao amanhecer e no segundo (2009-2010), das 19h00 ao amanhecer. Estas redes eram armadas rentes ao solo e com 2 metros de altura e 7 metros de comprimento, na entrada da Gruta da Fada do PEC, entrada do Sumidouro da Gruta dos Jesuítas e possíveis corredores de voo dos morcegos, num esforço de coleta totalizando 300h/noite/rede (**Figuras 3 e 4**). Acredita-se que *D. rotundus* utilizam as trilhas como corredores de voo, uma vez que estas também são utilizadas pelas presas, sendo estas silvestres ou não (UIEDA, comunicação pessoal)



FIGURA 3: SUMIDOURO DA GRUTA DOS JESUÍTAS. Devido à visitação no PEC, sofre grande impacto antrópico. **A)** Vista interior da entrada, a qual possui cerca de 7 m de largura e 9 m de altura, nas maiores dimensões. **B)** Vista lateral de uma rede de neblina (*mist-net*) armada fechando a entrada da caverna.

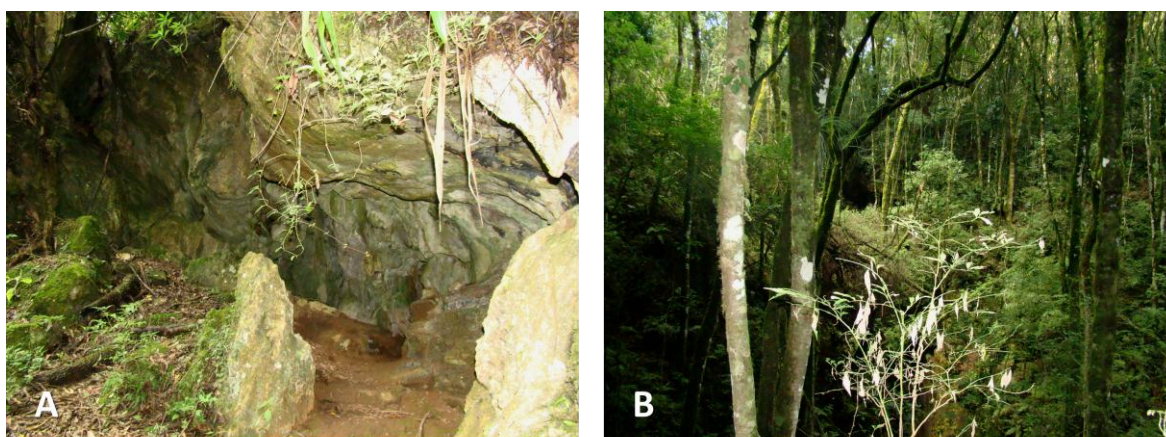


FIGURA 4: GRUTA DA FADA. **A)** Vista exterior da entrada, a qual possui cerca de 6 m de largura e 2 m de altura, nas maiores distâncias. **B)** Ao fundo, a entrada da Gruta da Fada vista da entrada da Gruta do Abismo Professor Schiebler, as quais são separadas cerca de 40 m de distância pela dolina.

Os morcegos retirados das redes foram acondicionados em saco de algodão de 30x20 centímetros (altura x largura) (MELLO *et al.*, 2004). Em seguida, foram identificados segundo a Chave Artificial de Identificação de Quirópteros Brasileiros de Vizotto & Taddei (1973) e soltos posteriormente. Precedendo a soltura, foram tomadas algumas informações biológicas e morfométricas. Foi escolhida a medida externa do antebraço (uso de um paquímetro analógico) para as análises, uma vez que esta além de ser mais fácil de ser tomada com o animal vivo no campo, é a medida corporal que menos varia entre os espécimes de mesma

espécie, condição ontogenética e sexo. A massa dos espécimes não foi tomada uma vez que os indivíduos se alimentam de uma grande quantidade de sangue. Assim, um indivíduo alimentado teria boa parte da sua massa superestimada pelo alimento contido no estômago (**Figura 5**).

O método de marcação individual dos espécimes se deu por pequenos furos feitos no patágio com uma numeração de três dígitos, representando a unidade, a dezena e a centena do espécime capturado. Também se colocou uma anilha de alumínio anodizado de formato em ômega com a denominação: “UFPR Zool” seguido da numeração. (**Figura 5-E**)

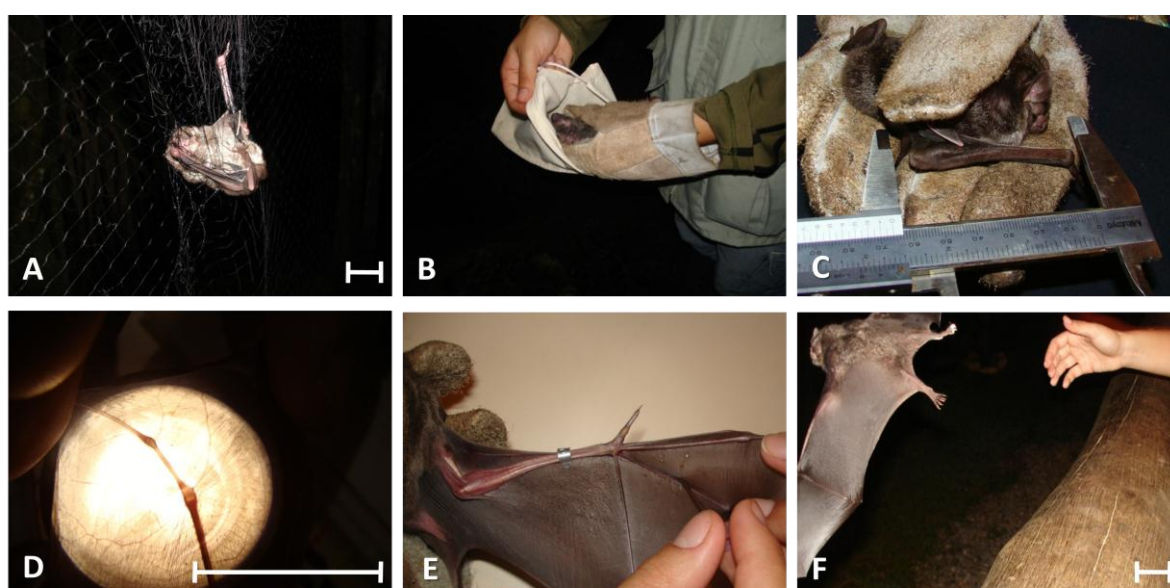


FIGURA 5: SEQÜÊNCIA DA METODOLOGIA UTILIZADA DURANTE AS CAPTURAS. A) Retirada do espécime da rede de neblina; B) Acondicionamento em saco de algodão; C) Medida de antebraço com uso de um paquímetro; D) Tomadas informações reprodutivas e ontogenéticas (nesta considerando o grau de ossificação das epífises dos metacarpos e falanges); E) Marcação individual no patágio e colocação da anilha numerada “UFPR Zool”; F) Soltura do espécime. Escala: 5 cm.

Além da determinação do sexo, foram também determinadas a condição de desenvolvimento (jovem ou adulto) e a condição reprodutiva em que o indivíduo era capturado (ativos ou inativos, de acordo com as características visíveis externamente) dos indivíduos. A condição ontogenética foi determinada pelo grau de ossificação das epífises dos metacarpos e primeiras falanges das asas (ANTHONY, 1988) (**Figura 5-D**). No entanto, esta determinação só permite que os indivíduos sejam classificados em jovens e adultos. Logo, indivíduos adultos eram aqueles que apresentavam as epífises totalmente ossificadas. Os indivíduos jovens foram considerados quando as epífises dos ossos longos das asas ainda estavam cartilaginosas, indicando que estavam ainda em fase de crescimento.

A atividade reprodutiva dos machos foi determinada de acordo com a posição dos testículos na bolsa escrotal, sendo que os machos inativos de *D. rotundus* mantêm os testículos na cavidade abdominal. As fêmeas ativas sexualmente foram aquelas encontradas grávidas ou lactantes. A gravidez foi determinada pela apalpação do seu abdômem para detectar a presença de feto. Fêmeas em lactação (lactantes) foram identificadas pela presença de leite em suas mamas, quando comprimidas pelos dedos da pesquisadora. A turgidez e o tamanho da mama foram utilizados para evidenciar se a fêmea já havia tido filhotes (múltipara) ou não (nulípara), no caso de fêmeas inativas.

A captura e coleta dos animais foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através da Licença de Coleta de Material Biológico. Ao passo que a Licença para Desenvolver Projeto na Unidade de Conservação do Paraná foi autorizada pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

Não houve necessidade de coletar espécimes para serem depositados como material-testemunho, uma vez que a espécie do mesmo local já fora depositada na Coleção Científica de Mastozoologia do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZUP) no ano de 2004 por Arnone & Passos (2007).

4.3 MÉTODOS DE ESTIMATIVA DE TAMANHO POPULACIONAL

A partir das informações sobre a biologia de *D. rotundus* foi possível inferir sobre estimativa do tamanho da população, com base em métodos de marcação-recaptura, assumindo-se que a população é fechada, uma vez que os efeitos de nascimentos, mortalidade e migração não são considerados, pois não são significativos (COMACK, 1992). Na análise dos dados de marcação-recaptura obtidos, utilizou-se o método não-paramétrico *Jackknife* para a estimativa de populações fechadas presentes na área amostral. Este método foi computacionalmente intensivo e pioneiro para a estimação de tendenciosidades e erros padrão, introduzido por volta de 1950, por Maurice Quenouille, e mais tarde aprimorado por Tukey (MILLER, 1974). É baseado na retirada sequencial de um ponto da amostra, em que são calculados novamente os estimadores citados anteriormente a partir da amostra reduzida contendo as $n - 1$ observações. Este estimador faz uma avaliação do tamanho da população baseada na frequência de indivíduos observada na amostra, e está inserido no *software* CAPTURE (REXSTAD & BURNHAM, 1991).

No *software* CAPTURE existem três fontes de variação que afetam a probabilidade de captura: variação temporal (M_t), variação de comportamento (M_b) e variação de heterogeneidade (M_h). A variação temporal (M_t) permite mudar a probabilidade de captura com o passar do tempo; a variação de comportamento (M_b) permite que a probabilidade de captura se altere após a sua primeira captura (atração ou repulsão); e, a variação de heterogeneidade (M_h) prediz que a probabilidade de captura dos animais seja única para cada indivíduo capturado, uma vez que pode haver heterogeneidade entre os sexos, condições reprodutiva e ontogenética etc. Além disso o *software* permite as combinações de todas as três fontes de variação, gerando modelos mais complexos para análise de dados, através do teste Z. Um outro estimador inserido no CAPTURE é o *Chao*. Utilizado para população com base no modelo M_h , este estimador é mais vantajoso do que o *Jackknife* quando a maior parte dos animais amostrados foram capturados apenas uma ou duas vezes (FERNANDEZ, 1995).

Com base no melhor modelo selecionado pelo CAPTURE, foi estimada a abundância populacional (\pm erro padrão), a probabilidade de captura por ocasião (p) e o intervalo de confiança (I.C. = 95%). A construção dos intervalos de confiança para todos os modelos é baseada na suposição de que o número de indivíduos não capturados na população é distribuído log-normalmente. O modelo mais simples para estimativa de abundância populacional, o modelo nulo (M_o), assume uma mesma e constante probabilidade de captura entre os indivíduos em todas as ocasiões. No entanto, isso é bastante improvável de acontecer com populações animais. Isto considerando os potenciais efeitos na probabilidade de captura e recaptura que podem ser causados pela resposta comportamental dos animais às redes de neblina (repulsão); pela variação do clima; pela heterogeneidade comportamental de cada indivíduo (territorialidade, estágio reprodutivo, sexo) ou das possíveis combinações destes fatores. Logo, o CAPTURE também estimou a abundância de mais seis diferentes modelos. Contudo, o *software* seleciona o melhor modelo, onde 1 indica o modelo que melhor se ajusta aos dados, e zero, o pior modelo.

É importante lembrar que a predição dos modelos e a interpretação devem estar associadas às informações sobre a biologia da espécie em questão (KARANTH *et al.*, 2003). Assim, de acordo com a característica comportamental dos morcegos se acostumarem e repelirem as redes de neblina após um período consecutivo de amostragem, foi esperado que o modelo M_h representasse o melhor modelo para a estimativa populacional de *D. rotundus* no PEC, assumindo uma variação na probabilidade de captura entre os indivíduos (OTIS *et al.*, 1978). Além disso, o modelo M_h é aquele que mais se insere na realidade das populações animais (FERNANDEZ, 1995).

Um histórico de captura para cada indivíduo foi construído na forma de uma matriz, na qual “1” indica a captura de um determinado indivíduo em uma determinada ocasião de amostragem e “0” indica a não amostragem deste indivíduo nesta ocasião (OTIS *et al.*, 1978). Para aumentar a probabilidade de captura, nas fases de campo que apresentaram duas noites consecutivas de amostragem, estas foram consideradas como uma única ocasião de captura, totalizando 14 ocasiões durante o período amostrado. Desta matriz formada, estimou-se a abundância de *Desmodus rotundus* para área amostral (Parque Estadual de Campinhos - PEC).

4.4 ANÁLISE DOS DADOS ECOLÓGICOS

Para verificar se o tamanho do antebraço apresenta diferença sexual, utilizou-se o Teste T de Student no *software* R versão 2.9.2, uma vez que são comparadas as médias de dois grupos de dados (machos e fêmeas) amostrados independentemente. Como hipótese nula, supõe-se que o tamanho do antebraço em machos e fêmeas é estatisticamente igual.

Os dados dos animais recapturados foram contrastados com aqueles que apresentaram apenas uma captura. Buscou-se identificar alguma característica biológica que inferisse sobre uma possível semelhança entre os indivíduos recapturados. Para tanto, foi utilizado a regressão logística múltipla e o modelo linear generalizado (“*generalized least model*”) para testar a dependência das variáveis: sexo, condição ontogenética (jovem ou adulto) e condição reprodutiva (ativo ou inativo). Ambos analisados no programa PAEntological STatistics (PAST) versão 1.98 (HAMMER *et al.*, 2001).

5 RESULTADOS

Nos locais amostrados com redes de neblina (**Tabela 1**), um total de 199 espécimes (142 machos e 57 fêmeas) foram capturados, inclusive nos meses de baixas temperaturas. Indivíduos jovens foram encontrados durante todo o ano, bem como aqueles ativos sexualmente, não havendo estação reprodutiva bem definida (**Tabela 2**).

Total de 60 recapturas, incluindo 26 indivíduos sendo capturados duas vezes, 7 indivíduos capturados três vezes e 2 indivíduos capturados quatro vezes. Dentre essas, dezesseis indivíduos marcados entre os anos de 2003 a 2004 por Arnone & Passos (2007) foram recapturados pelo menos uma vez.

Além disso, foram observados movimentos locais entre as cavernas amostradas, sendo que houve treze ocorrências de um espécime ter sido capturado na entrada de uma caverna e, na mesma noite, encontrado na entrada de outra caverna. Inclusive, a grande maioria dos espécimes capturados apresentava punho e pés sujos de barro, evidenciando que estes animais estavam empoleirados dentro das cavernas.

TABELA 1: LOCAIS AMOSTRADOS COM REDES DE NEBLINA NO PEC E RESPECTIVO ESFORÇO E FREQUÊNCIA DE CAPTURA. Sendo: frequência absoluta (F_{absoluta}) e frequência relativa (F_{relativa}) dos indivíduos de *D. rotundus* encontrados.

Local amostrado no PEC	Capturas		
	esforço (h)	F_{absoluta}	F_{relativa} (%)
Gruta dos Jesuítas (Sumidouro)	45	76	38,19
Gruta dos Jesuítas (Ressurgência)	225	32	16,08
Gruta da Fada	225	47	23,62
Gruta do Abismo Professor Schiebler	225	15	7,54
trilhas e estrada	270	29	14,57

TABELA 2: NÚMERO DE INDIVÍDUOS, CONDIÇÃO ONTOGENÉTICA E REPRODUTIVA DE *D. ROTUNDUS* CAPTURADAS NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2007 A MAIO DE 2008 E JUNHO DE 2009 A MARÇO DE 2010, NO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS. Sendo “TA” os espécimes cujos testículos se encontravam na cavidade abdominal; “TE” espécimes cujos testículos estavam visivelmente na bolsa escrotal; “nulípara” a fêmea que ainda não esteve grávida; “múltipara” a fêmea que já tendo tido pelo menos uma gravidez; “lactante” aquela com mamas aleitadas; “pós-lact” aquela com mamas túrgidas e sem pêlos ao redor; “grávida” aquela com feto diagnosticado por apalpação.

sexo	c. ontog	c. reprod	Jun/07	Jul/07	Set/07	Fev/08	Mai/08	Jun/09	Jul/09	Ago/09	Out/09	Nov/09	Dez/09	Jan/10	Fev/10	Mar/10	TOTAL
macho	jovem	TA	1	6	1	4	7	0	2	2	5	8	5	1	3	4	46
		TE	0	0	1	2	1	0	0	0	0	2	1	0	2	2	11
	adulto	TA	10	0	2	6	9	9	6	2	0	3	0	2	3	2	54
		TE	2	4	1	3	5	2	1	0	0	4	0	2	3	1	28
fêmea	jovem	nulípara	1	2	1	6	5	4	0	1	0	1	0	0	1	3	25
		múltipara	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	4
		lactante	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		pós-lact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		grávida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	adulto	nulípara	1	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	6
		múltipara	1	2	0	1	2	3	1	1	0	0	0	0	0	1	12
		lactante	1	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
		pós-lact	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	3
		grávida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TOTAL		19	19	6	23	30	20	11	7	6	19	6	7	12	14	

O movimento de saída e entrada nas cavernas pelos morcegos se deu durante praticamente todo o período noturno. No entanto, o padrão de atividade de forrageio se deu por um pico de atividade na primeira hora da noite (saída do abrigo), outros na sexta e oitava hora e um último ao amanhecer (retorno ao abrigo) (**Figura 6**).

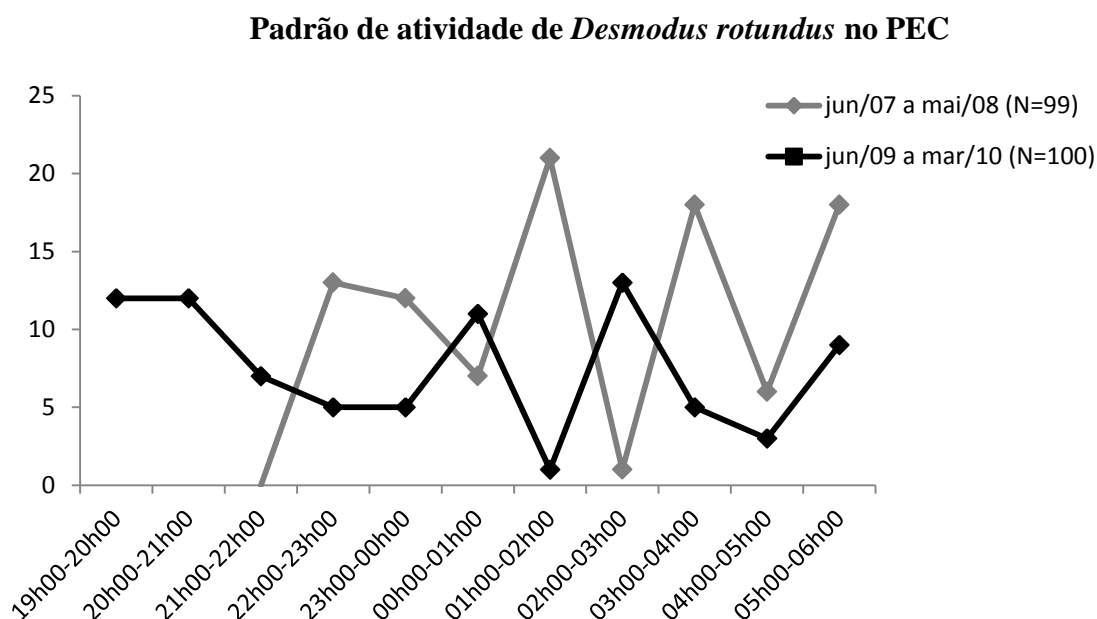


FIGURA 6: PADRÃO DE ATIVIDADE DE DESMODUS ROTUNDUS NO PEC DURANTE OS PERÍODOS DE JUNHO DE 2007 A MAIO DE 2008 E JUNHO DE 2009 A MARÇO DE 2010. Sendo que no primeiro período as redes de neblina eram abertas das 21h00 ao amanhecer e no segundo das 19h00 ao amanhecer.

Durante as sessões de capturas nos meses de julho, agosto e outubro, foram observados na Gruta da Fada ataques a morcegos que se encontravam presos à rede de neblina. Espécimes de *D. rotundus* foram encontrados, três em 28/jul/2009 e um em 27/out/2009, mortos com a cabeça e/ou o tórax devorados (**Figura 7-A**). As asas foram ignoradas pelo predador em todas as ocasiões. Observou-se nesta última data uma cuíca-de-quatro-olhos (*Philander frenatus*) (**Figura 7-B**) em posição bípede segurando a rede com os membros anteriores e abaixando-a para que lhe fosse possível alcançar um espécime de *D. rotundus* preso, sendo que neste momento o morcego já havia sido decapitado.

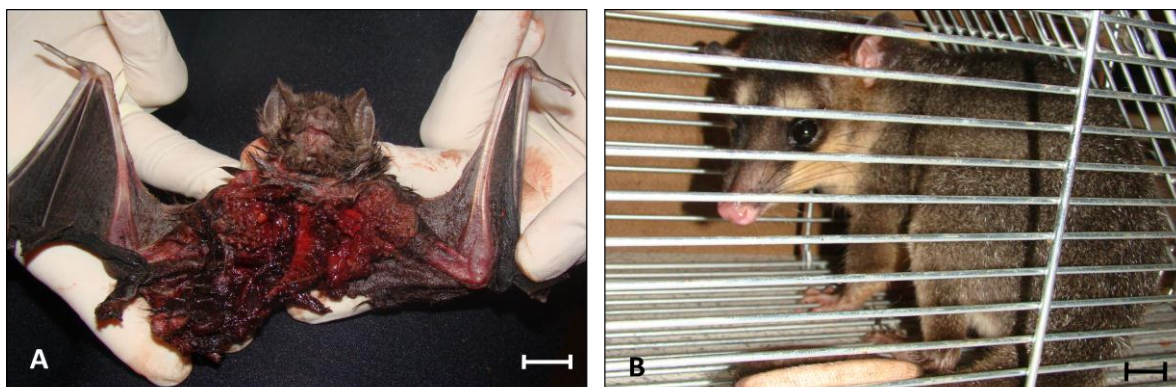


FIGURA 7: EVIDÊNCIA DO ATAQUE DE PREDADOR A MORCEGO EM REDE DE NEBLINA. A) Espécime de *Desmodus rotundus* encontrado morto na rede de neblina armada na Gruta da Fada. **B)** Captura do predador com armadilha do tipo gaiola, armada ao lado da rede de neblina. Trata-se de *Philander frenatus*, conhecida como cúica-de-quatro-olhos.

Após estes incidentes descritos acima, nenhum espécime de *D. rotundus* foi capturado na Gruta da Fada nos meses subseqüentes de Novembro/09, Dezembro/09 e Janeiro/10. No entanto, eram observados alguns indivíduos saindo da caverna e desviando da rede de neblina armada na entrada desta. Logo, em 16 de Fevereiro de 2010, temendo a possibilidade da interferência do uso mensal de redes de neblina armadas na entrada acrescido do incidente da morte de alguns indivíduos pela cúica-de-quatro-olhos ter causado abandono do abrigo por parte das colônias que habitam o local. Optou-se, então, por adentrar a caverna para verificar se era possível observar a presença da espécie no local. Dois observadores munidos de lanternas com luz vermelha entraram na caverna no período da tarde, durante aproximadamente 50 minutos.

Com base no aspecto geral da face puderam, em alguns casos, identificar jovens e adultos, mas nenhum filhote foi encontrado. O avistamento dos órgãos genitais e/ou o tamanho corpóreo permitiram que alguns indivíduos pudessem ser identificados como machos e fêmeas. Além disso, em virtude da marcação com anilha de machos ser no antebraço direito e de fêmeas, no esquerdo, alguns indivíduos marcados *a priori* puderam ser sexados com maior acurácia. Apesar da dificuldade de contagem dos indivíduos que voavam ao se sentirem incomodados com a nossa presença, foram avistados pelo menos 21 indivíduos distribuídos em sete pequenos agrupamentos (**Figura 8 e 9**).



FIGURA 8: MAPA TOPOGRÁFICO DA GRUTA DA FADA EVIDENCIANDO OS AGRUPAMENTOS DE *D. ROTUNDUS* ENCONTRADOS EM 16/FEV/10.

Quando possível, os indivíduos foram identificados como machos, fêmeas e/ou jovens e adultos. Sendo “F” para fêmeas, “FA” para fêmeas adultas, “M” para machos, “MJ” para machos jovens, “MA” para machos adultos e “n/i” para indivíduos não puderam ter sido identificados sexo e condição ontogenética.

Adaptado de PARANÁ (2003)

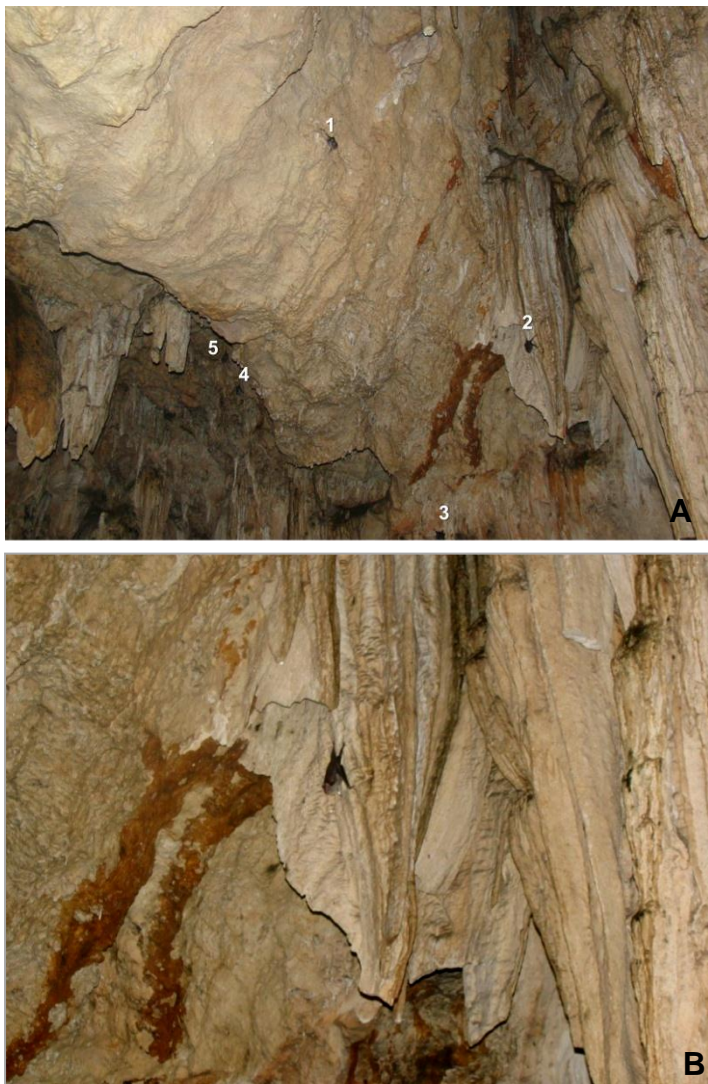


FIGURA 9: INTERIOR DA GRUTA DA FADA DO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS - PR. A) Evidência do uso da caverna como abrigo diurno por cinco indivíduos de *Desmodus rotundus*. **B)**

Detalhe de um indivíduo macho de *D. rotundus* com marcação individual feita no antebraço direito por anilha metálica numerada.

A morfometria do antebraço se manteve dentro do intervalo de variação publicado na literatura, sendo $62,89 \text{ mm} \pm 1,83$ para fêmeas e $60,43 \text{ mm} \pm 1,24$ para machos. O Teste T de Student, realizado no programa R, para a análise do tamanho do antebraço dos 144 indivíduos distintos (101 machos e 42 fêmeas) revelou que houve diferença entre os sexos ($t = 6,99$).

Tamanho do antebraço em fêmeas e machos de *D. rotundus* no PEC

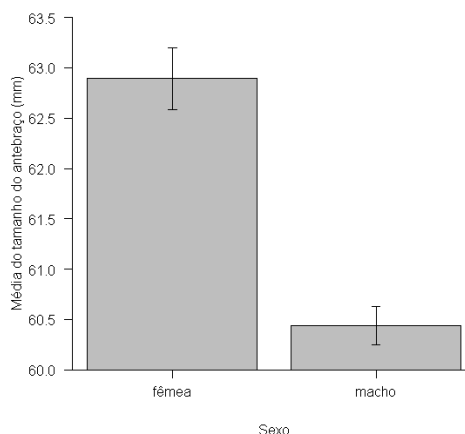


FIGURA 10: MÉDIA DO TAMANHO DO ANTEBRAÇO EM FÊMEAS E MACHOS DE *DESMODUS ROTUNDUS* NO PEC.

Apesar da identificação dos ectoparasitas não ter sido realizada neste estudo, notou-se que a grande maioria dos espécimes de *D. rotundus* não apresentava nenhum ectoparasita, seja ácaros ou dípteros. E, quando ocorriam, não havia infestações de vários ectoparasitas como visto em outras espécies de morcegos (insetívoros e nectarívoros) que eventualmente também eram capturados nas redes de neblina.

Na regressão logística múltipla analisada no PAST não houve efeitos significativos para as variáveis sendo “sexo” ($F = 0.35$, $p = 0.55$), “condição ontogenética” ($F = 0.42$, $p = 0.52$) e “condição reprodutiva” ($F = 0.26$, $p = 0.61$). Ao realizar combinações entre duas e três variáveis, os efeitos se mantiveram não-significativos, sendo “sexo-condição ontogenética” ($F = 0.19$, $p = 0.67$), “sexo-condição reprodutiva” ($F = 0.72$, $p = 0.34$), “condição reprodutiva-condição ontogenética” ($F = 0.78$, $p = 0.39$) e “sexo-condição reprodutiva-condição ontogenética” ($F = 0.13$, $p = 0.71$). Ambos os casos foi considerado apenas um grau de liberdade (G. L.). Ainda no PAST, o modelo linear generalizado (“*generalized least squares*”) também não apresentou significância para sexo ($F = 0.02$; $p = 0.89$), condição ontogenética ($F = 0.06$; $p = 0.8$) e condição reprodutiva ($F = 0.22$; $p = 0.63$), sendo G. L. = 1.

A partir dos dados analisados no *software* CAPTURE, a estimativa de tamanho populacional de *D. rotundus* para o Parque Estadual de Campinhos, considerado o modelo que melhor se ajustou aos dados para machos e fêmeas simultaneamente (modelo M_{th}) foi de 365 indivíduos, com intervalo de confiança de 274 a 521 indivíduos. O teste Z para machos e fêmeas simultaneamente não confirmou a hipótese de população fechada durante o período de amostragem ($Z = -3.1$; $p \approx 0.001$).

TABELA 3: TESTE PARA POPULAÇÕES FECHADAS UTILIZANDO O PROGRAMA CAPTURE. Demonstrando valores para Z do teste de *Jackknife* e significância da probabilidade de captura por ocasião (p) e os valores encontrados para cada um dos modelos. *Modelo mais apropriado.

	estimador Jackknife		Modelos selecionados							
	Z	p	M_o	M_h	M_b	M_{bh}	M_t	M_{th}	M_{tb}	M_{tbh}
machos e fêmeas	-3.104	0.00096	0.16	0.00	0.31	0.16	0.96	1.00*	0.94	0.42
machos	2.758	0.00291	0.22	0.06	0.00	0.05	1.00*	0.75	0.34	0.25
fêmeas	3.063	0.99890	0.15	0.00	0.33	0.03	1.00*	0.68	0.31	0.35

TABELA 4: TAMANHO POPULACIONAL ESTIMADO EM DECORRÊNCIA DA SELEÇÃO DO MODELO MAIS APROPRIADO, UTILIZANDO O PROGRAMA CAPTURE. Sendo I. C. o intervalo de confiança do número de indivíduos estimado.

	número de indivíduos estimado	I.C.	(±) erro padrão
machos e fêmeas	365	274 a 521	61.45
machos	250	181 a 380	49.12
fêmeas	23	21 a 31	2.30

Quando analisados separadamente, os machos apresentaram o modelo de seleção M_t e uma estimativa de 250 indivíduos, com intervalo de confiança de 181 a 380 indivíduos. Entretanto, não foi corroborada a hipótese inicial de população fechada para machos ($Z = 2.758$; $p \approx 0.003$). Já para as fêmeas, o modelo que mais se mostrou adequado foi o M_t e uma estimativa de 23 indivíduos. No entanto, foi corroborada a hipótese de população fechada para fêmeas, com intervalo de confiança de 21 a 31 indivíduos ($Z = 3.063$; $p \approx 0.999$).

6 DISCUSSÃO

As 57 fêmeas (28,6% do total) e ausência de filhotes capturados podem ter sido causadas pelo fato de que as fêmeas e filhotes costumam manter-se nos abrigos durante alguns períodos, em agrupamentos chamados de “creches”. No entanto, a presença de um maior número de lactantes (seis) em relação às grávidas (um), contradiz esta formação de “creches” uma vez que lactantes estão forrageando e não permanecendo junto às fêmeas e aos filhotes no abrigo. Além disso, o grande número de machos jovens e adultos pode inferir sobre uma maior atividade de forrageio em busca de alimento e/ou fêmeas. No Estado de São Paulo, Uieda *et al.* (1992) encontrou mais da metade dos agrupamentos contendo somente machos ou principalmente machos. O mesmo foi encontrado na Argentina (DELPIETRO *et al.*, 1992). Uieda *et al.* (1992) no entanto acredita que isso seja consequência do uso tóxico da pasta vampiricida nos morcegos esteja eliminando seletivamente mais fêmeas do que machos.

Os indivíduos em atividade reprodutiva foram capturados uniformemente durante os períodos amostrados, inclusive nos meses de baixas temperaturas. Isto provavelmente ocorra devido à disponibilidade de alimento (sangue) ser estável (KUNZ, 1982), não havendo sazonalidade. A área de estudo (municípios de Cerro Azul, Tunas do Paraná e Bocaiúva do sul – Paraná) apresenta uma das mais intensas regiões de criação de suínos e caprinos do Estado do Paraná, além de apresentar diversas pequenas habitações humanas nas quais se tem cerca de uma dúzia de animais de criação (principalmente: cachorro, gado, cavalos, galinhas). Marinho-Filho & Sazima (1989) e Marín *et al.* (2008) também encontraram semelhante resultado. A ocorrência de reprodução de *D. rotundus* em Floresta Ombrófila Mista em qualquer estação do ano, também foi vista por Alencar *et al.* (1994) no Nordeste do Brasil.

Sabe-se que o método de determinação da idade em morcegos em campo é limitado, restringindo apenas algumas classes, como filhotes (não capturados neste estudo), jovens e adultos. Da forma semelhante, a determinação da condição reprodutiva também é subestimada, isto porque, por exemplo, fêmeas grávidas só podem ter seus fetos diagnosticados através de apalpação quando estes já estão com algumas semanas de desenvolvimento. No caso dos machos de *D. rotundus* observou-se que a maioria dos indivíduos era encontrada com os testículos na cavidade abdominal, mas diante do stress causado pela manipulação do animal, passavam a exteriorizá-los. Diante deste fato, passou a anotar, ainda na rede de neblina, a condição reprodutiva a qual o animal se encontrava. Quanto ao tamanho do antebraço de machos e fêmeas, houve correspondência ao descrito na literatura.

Os indivíduos capturados neste estudo que haviam sido marcados com anilhas por Arnone & Passos em 2003 e 2004 no PEC evidenciam a longevidade de no mínimo 7 anos de idade. Delpietro *et al.* (1992) recapturou na Argentina um espécime 16 anos depois da primeira recaptura, numa distância de até 3 km do local onde o indivíduo foi anilhado.

Como dito anteriormente, a marcação individual do espécime não pode afetar a capturabilidade do animal e nem ser perdida durante a amostragem. Além disso, não deve comprometer o bem-estar animal, como descrito em Patricio-Costa *et al.* (2008). Apenas em Janeiro de 2010, notou-se que um indivíduo teve sua anilha perdida, o que só foi percebido uma vez que a coleta de tecido da asa (Capítulo 3), apesar de regenerar o pedaço retirado, deixa uma pequena cicatriz. Assim, as anilhas de alumínio anodizado em ômega foram eficazes, porque são leves e não causaram ferimentos na grande maioria dos espécimes.

A taxa de recaptura de 30,1% demonstrou fidelidade pelo abrigo e locais de forrageio. Houve pequenas flutuações na distribuição destas recapturas ao longo do ano, decorrentes provavelmente das variações climáticas e de temperatura. Além disso, pode haver variação individual, já que provavelmente alguns indivíduos percebem a rede de neblina com mais facilidade do que outros.

O primeiro pico de atividade observado nas entradas da caverna e corredores de vôo foi congruente aos encontrados por diversos autores (MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1989; UIEDA, 1992), correspondendo à saída do abrigo diurno na primeira hora após ao anoitecer. E assim como visto por Marinho-Filho & Sazima, houve pequenas atividades de forrageio durante a noite. Na Costa Rica, foi encontrado um padrão bimodal com picos entre 02h00min e 03h00min (TURNER, 1975). Isto porque provavelmente os morcegos-vampiros não utilizam todo o tempo disponível da noite para se alimentar. Em noites de baixa luminosidade eles também podem explorar o entorno, com o intuito de encontrar potenciais fontes de alimento e abrigo, além de propiciar as interações sociais e reprodutivas, como sugere Turner (1975). Além disso, apesar de não terem sido tomadas informações a respeito do lado em que o morcego cai na rede de neblina, notou-se que a maioria dos indivíduos saía do abrigo no início da noite (hora 1 e 2) e entravam na metade (hora 6) e no final (hora 11 ou 12) da noite. Além disso, foram observados movimentos locais entre as cavernas amostradas, assim como visto por Alencar *et al.* (1994), porém no nordeste do Brasil.

O ataque oportunístico do marsupial aos morcegos na rede de neblina foi possível porque a caverna possui uma abertura relativamente pequena e a rede foi armada rente ao chão, permitindo que algum animal de porte pequeno a médio os atacasse. Muitas vezes são encontrados morcegos atacados na rede de neblina, mas pouco se conhece sobre quais animais

são os responsáveis por esta predação oportunista. Assim, a observação da predação da cuíca *Philander frenatus* se alimentando de três espécies diferentes de morcegos é um importante registro acerca da ecologia da cuíca-de-quatro-olhos, bem como os potenciais predadores de morcegos (PATRICIO-COSTA *et al.*, 2010).

Na Costa Rica, Wilkinson (1988, 1990) relatou que os agrupamentos de *D. rotundus* podem mudar de abrigo caso o ambiente passe a ser desfavorável. O adentramento à caverna realizado por mim e um colega possibilitou a observação direta de mais de 20 indivíduos de *D. rotundus* distribuídos em pequenos agrupamentos (até quatro indivíduos). Não foram observados grandes agrupamentos, no entanto sabe-se que cavernas podem apresentar colônias constituídas por cerca de dois agrupamentos principais e diversos indivíduos isolados e/ou em pequenos grupos no interior do abrigo (GOMES & UIEDA, 2004). Além disso, foi observada indiretamente a coabitação de *D. rotundus* com diversas espécies de morcegos, como *Myotis* sp., *Chrotopterus auritus*, *Diphylla ecaudata*, *Anoura caudifer*, *Glossophaga soricina*, *Mimon bennettii*, *Carollia perspicillata* e *Eptesicus furinalis*.

Quanto à capturabilidade, uma maior frequência de captura não necessariamente reflete a inexperiência do morcego-vampiro à rede de neblina, podendo refletir também numa maior frequência de forrageio em busca de recursos, interações sociais e reprodutivas. No entanto, estatisticamente, os animais recapturados neste estudo não apresentaram semelhanças quanto ao sexo, à condição reprodutiva ou ontogenética, em relação àqueles que apresentaram apenas uma captura. Assim, não foi possível identificar qual a característica biológica que acarreta numa maior taxa individual de recaptura.

A literatura mostra que os mamíferos comumente apresentam grandes problemas para a estimativa do tamanho da população especialmente devido à complexidade de seu comportamento. Diante disso, apesar do estimador *Jackknife* não ter confirmada a hipótese de população fechada para *D. rotundus*, ainda acredita-se que a população seja fechada no PEC. Isto porque não houve capturas de filhotes ou juvenis (apenas adultos e jovens que poderiam ser considerados subadultos), não ocorreram picos de reprodução, não houve grandes flutuações de densidade populacional. Não obstante, alguns indivíduos capturados apresentaram grande longevidade, pois foram marcados em 2003-2004 por Arnone & Passos e capturados neste estudo (2009-2010). Contudo, apesar do p baixo para populações fechadas, provavelmente ocorreu uma baixa amostragem da população, o que sugere que a população seja muito grande.

A estimativa de tamanho de população não pôde ser calculada para machos e fêmeas (simultaneamente) e machos. Durante as sessões de captura, um grande número de machos foi

capturado (mais de 71% do total de capturas), o que pode ter influenciado a baixa probabilidade de machos e fêmeas conjuntamente, no que tange a afirmação de população fechada.

Diferentemente como se previa, o modelo M_h não foi o mais apropriado para a estimativa da população de *D. rotundus*. Pelo contrário, M_h foi o modelo que pior se adequou aos dados dos indivíduos (macho e fêmeas; machos; e fêmeas). Assim, o modelo no qual se assume que a probabilidade de capturas das fêmeas e dos machos (em separado) varia com o tempo é o mais adequado.

Algumas fêmeas costumam permanecer no agrupamento durante algum período da noite para auxiliar no cuidado parental, o que deve explicar a baixa captura destas. Então provavelmente o pequeno tamanho da população de fêmeas estimado (cerca 23 indivíduos) pode ter sido, estatisticamente, reflexo do baixo número de indivíduos capturados, uma vez que apesar de poucas fêmeas, e muitas destas foram recapturadas. Porque os estimadores de tamanho de população utilizam informações sobre o número de animais marcados e sua proporção em amostras subseqüentes.

Logicamente que o procedimento de seleção do modelo não resulta necessariamente no modelo verdadeiro, o qual seria uma representação exata da verdadeira estrutura de probabilidades de captura do estudo. Qualquer modelo é uma simplificação da real complexidade existente nos dados. Portanto, o modelo mais apropriado dependerá da quantidade e qualidade dos dados disponíveis.

7 CONCLUSÃO

A taxa de recaptura demonstrou fidelidade pelo abrigo e locais de forrageio, apesar de ter sido encontrado vários eventos de movimentação entre as cavernas e corredores de vôo. Além disso, não foi verificada uma estação reprodutiva bem definida. Espécimes foram encontrados durante todo o ano. Esses resultados auxiliam no conhecimento da espécie no que tange a estrutura da população e às influências climáticas na atividade de forrageio.

As várias ocorrências de entrada e saída de *D. rotundus* na primeira parte da noite corroboram com o comportamento de partilha alimentar entre os indivíduos da colônia descrito por Wilkinson (1985). Este comportamento traz uma vantagem seletiva para a manutenção coesiva entre as fêmeas do grupo, as quais são a unidade social primária da colônia de morcego-vampiro. Os resultados de padrão de atividade obtidos com este estudo permitiram uma melhor compreensão da dinâmica temporal e sazonal de *D. rotundus*, bem como para um maior conhecimento de como a espécie utiliza o local em que vive. E apesar de terem alta adaptabilidade e alta abundância, espécimes de morcego-vampiro-comum são susceptíveis às mudanças ambientais. Assim, sendo a primeira e última hora as mais significativas, enfatiza-se a importância de se evitar a ação antrópica excessiva no Conjunto Fada-Jesuítas, respeitando-se os horários de visitação e de inspeção rotineira feita por turistas e funcionários, respectivamente.

Embora se acreditasse que houvesse alguma relação entre a capturabilidade de fêmeas, machos, ativos reprodutivamente, inativos reprodutivamente, jovens e adultos; isto não foi considerado significativo. Em nenhum dos casos houve predominância signitiva do sexo, condição reprodutiva ou ontogenética. Talvez isto tenha ocorrido pelo baixo número de fêmeas capturadas.

Uma das principais premissas do método de captura-recaptura para populações fechadas é a ausência de recrutamento (nascimento ou imigração) ou de perdas (morte ou emigração) de indivíduos durante o período de amostragem. Portanto, o ideal seria fazer o levantamento populacional em duas noites consecutivas (uma vez que os indivíduos podem ficar no máximo dois dias sem se alimentar). Além disso, considerando as limitações do tamanho da área amostral, o ideal seria fossem armadas diversas redes de neblina em todas as entradas das cavernas e em todas as trilhas (prováveis corredores de v o). No entanto, obviamente isto não   viável na maioria dos estudos. As limitações financeiras e de tempo nem sempre permitem uma metodologia próxima da ideal para a realização de estimativas de

abundância. Logo, os estimadores do *software* CAPTURE não permitiram que se fossem feitas extrapolações confiáveis de tamanho estimado da população.

O Decreto nº 6.640 de 7 de novembro de 2008, dentre outros aspectos, visa a redução das áreas cavernícolas para a exploração mineral, uma vez que apenas ambientes subterrâneos considerados de máxima relevância serão totalmente preservados. No PEC, a visitação a grande maioria das cavernas do Complexo Fada-Jesuítas é diária e intensa (principalmente nos períodos de férias escolares), embora seja controlada pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP). Além disso, a porção paranaense do Vale do Ribeira como um todo sofre com o avanço da atividade mineradora e agropecuária, além da construção de cidades no entorno. Assim, mediante os atuais fatos sócio-econômicos no Brasil sobre a redução das áreas cavernícolas e analisando o crescente processo de redução das áreas de floresta ombrófila mista, estudos referentes à quiropterofauna destes locais tornam-se cada vez mais relevantes.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. M. S. Subfamília Desmodontinae. *In: Morcegos do Brasil*. REIS, N. R. dos; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Org.). Londrina: UEL/SEMA, p. 37-44, 2007.
- ALENCAR, O. A.; SILVA, G. A. P.; ARRUDA, M. M.; SOARES, A. J.; GUERRA, D. Q. Aspectos biológicos e ecológicos de *Desmodus rotundus rotundus* (Chiroptera) no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 14, n. 4, 95-103, 1994.
- ANTHONY, E. L. P. Age determination in bats. *In: Ecological and behavioral for study of bats*. KUNZ, T. H. (Ed.). Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 533f., 1988.
- ARNONE, I. S.; PASSOS, F. C. Estrutura de comunidade da quiropteroфаuna (Mammalia, Chiroptera) do Parque Estadual de Campinhos, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira Zoologia**. v. 24, n. 3, p. 573-581, 2007.
- CAMPANHÃ, R. A.; FOWLER, H.G. Roosting assemblages of bats in Arenitic caves in remnant fragments of Atlantic forest in Southeastern Brazil. **Biotropica**. v. 25, n. 3, p. 362-365, 1993.
- CARDOSO, M.; UIEDA, W.; BREDT, A. Influência do ciclo lunar na utilização de presas por *Desmodus rotundus*. *In: Cadernos de Resumos*, XXI Congresso Brasileiro de Zoologia. v. 21, p. 240, 1996.
- COMACK, D. G. Internal estimation for mark-recapture studies of closed populations. **Biometrics**, v.48, p.567-76, 1992.
- CRESPO, R. F.; LINHART, S. B.; BURNS, R. J.; MITCHELL, G. C. Foraging behavior of the common Vampire bat related to moonlight. **Journal of Mammalogy**. v. 53, n. 2, p. 366-368, 1972.
- DALQUEST, W. W. Natural History of the Vampire Bats of Eastern Mexico. **American Midland Naturalist**. v. 53, n. 1, p. 79-87, 1955.
- DELPIETRO, H.A., MARCHEVSKY, N.; SIMONETTI, E. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 14, p. 13-20, 1992.

ESBÉRARD, C. E. L. Influência do ciclo lunar na captura de morcegos Phyllostomidae.

Iheringia, Série Zoologia. Porto Alegre, v. 97, n. 1, p. 81-85, mar. 2007.

FERNANDEZ, F. F. S. Métodos para estimativas de parâmetros populacionais por captura, marcação e recaptura. *In: Oecologia brasiliensis*. PERES-NETO, P. R.; VALENTIN, J. L.; FERNANDEZ, F.A.S. (Eds.). vol. 2: Tópicos em tratamento de dados biológicos. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, p. 1-26

GOMES M.N.; UIEDA W. Abrigos diurnos, composição de colônias, dimorfismo sexual e reprodução do morcego hematófago *Desmodus rotundus* [E. Geoffrey] (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo, Brasil. 2004. **Revista Brasileira de Zoologia.** v. 21, n. 3, p. 629-638.

GREENHALL, A. M. Notes on the behavior of captive vampire bats. **Mammalia.** v. 29, n. 4, p. 441-451, 1965.

GREENHALL, A. M.; PARADISO, J. L. **Bats and bat banding.** Resource Publication nº 72, Washington D. C., United States, Wildlife Management Institute, 1968.

GREENHALL, SCHMIDT & LOPEZ-FORMENT. Field observations on the mode of attack of the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Mexico. **Anales del Instituto de Biología da University Nacional Autónoma do México Serie Zoología.** v. 2, p. 245-252, 1971.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: PAleontological STatistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica.** v. 4, n. 1, p. 9, 2001 http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. Acesso em: 25/mai/2010.

KARANTH, K. U.; NICHOLS, J. D.; CULLEN, L. JR. Armadilhamento fotográfico de grandes felinos: algumas considerações importante. *In: Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre.* CULLEN, L. Jr.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PÁDUA, C. (Eds.) Curitiba: Editora UFPR, p. 285-290, 2003.

KEEN, R. Mark-Recapture estimates. *In: Ecological and behavioral methods for the study of bats.* KUNZ, T. H. (Ed). Washington DC, United States: Smithsonian Institution Press, p. 157-170, 1988.

- KLEIN, R. M. Fitofisionomia e notas sobre a vegetação para acompanhar a planta fitogeográfica de partes dos municípios de Rio Branco do Sul, Bocaiúva do Sul, Almirante Tamandaré e Colombo. **Boletim da UFPR: Geografia Física**. v. 3, p. 1-33, 1962.
- KREBS, C. J. **Ecological Methodology**. 2^a ed. Longman, United States: Mento Park, 620p. 1999.
- KUNZ, T. H. **Roosting Ecology of bats**, p.1-55. *In*: KUNZ, T.H. (Ed.) Ecology of Bats. New York, Plenum, 425 f., 1982.
- KUNZ, T. H.; FENTON, M. B. **Bat Ecology**. Chicago and London, The University of Chicago Press, 779 f., 2005.
- KUNZ, T. H.; PIERSON, E. D. *In*: NOWAK, R. M. **Walker's bats of the world**. Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press, 287 f., 1994.
- MARIN, A. C. S.; BRAVO, C. M. M.; RICARDO, A. M. M.; OZUNA, S. C. O.; FUENTES, Y. L. O.; ESPINOSA, L. M. S.; TONO, R. D. Refugios, período reproductivo y composición social de las poblaciones de *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810) (Chiroptera: Phyllostomidae), em zona rurales del Departamento de Sucre, Colombia. **Caldasia**. v. 30, n.1, p.127-134, 2008.
- MARINHO-FILHO, J. S.; SAZIMA, I. Activity patterns of six phyllostomid bat species in southeastern Brazil. **Revista Brasileira Biologia**. v. 49, n. 3, p. 777-782, 1989.
- MELLO, M. A. R.; SCHITTINI, G. M.; SELIG, P.; BERGALLO, H. G. Seasonal variation in the diet of the bat *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) in an Atlantic Forest area in southeastern Brazil. **Mammalia**. v. 68, n. 1, p. 49-55, 2004.
- MILLER, R. G. The Jackknife: a review. **Biometrika**. v.61, p. 1-15, 1974.
- OLIVEIRA, K. L.; SIPINSKI, E. A. B. Mamíferos de quatro sistemas cársticos da Região Metropolitana de Curitiba, PR. **Conservando cavernas: 15 anos de espeleologia GEEP-Açungui**. Curitiba: GEEP-Açungui, 214f., 2001.
- OTIS, D. L.; BURNHAM, K. P.; WHITE, G. C.; ANDERSON, D. R. Statistical inference from the capture data on closed animal population. **Wildlife Monographs**. v. 62, p. 1-135, 1978.

PARANÁ. Instituto Ambiental do Paraná – IAP. **Plano de Manejo do Parque Estadual de Campinhos**. Curitiba: IAP, 2003.

PATRICIO-COSTA, P.; MUNSTER, L. C.; KAKU-OLIVEIRA, N. Y.; PASSOS, F. C. Problemas envolvendo anilhamento em morcegos. *In: Caderno de Resumos*, XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia, 2008.

PATRICIO-COSTA, P.; PIE, M. R.; PASSOS, F. C. Ataques oportunistas da cuíca *Philander frenatus* (Mammalia, Didelphidae) a morcegos em redes de neblina. **Chiroptera Neotropical**. v. 16, n. 1, Supl.: S41-S42, 2010.

PEDRO, W.; TADDEI, V. A. Taxonomic assemblage of bats from Panga Reserve, Southeastern Brazil: abundance patterns and trophic relations in the Phyllostomidae (Chiroptera). **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, N. Sér.** v. 6, p. 3-21, 1997.

____ Temporal distribution of five bat species (Chiroptera, Phyllostomidae) from Panga Reserve, South-eastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 19, n. 3, p. 951-954, 2002.
PINTO-DA-ROCHA, R. Invertebrados cavernícolas da porção meridional da Província Espeleológica do Vale da Ribeira, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 10, n. 2, p. 229-255, 1994.

____ Sinopse da fauna cavernícola do Brasil (1907-1994). **Papéis Avulsos de Zoologia**. v. 39, n. 6, p. 61- 173, 1995.

REIS, N. R. Estrutura de comunidade de morcegos na região de Manaus. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 44, n. 3, p. 247-254, 1984.

REXSTAD, E.; BURHAM, K. P. **User's guide for interactive program CAPTURE**: abundance estimation of closed animal populations. Collins, 30f, 1991.

SCHWARZ, C. J.; ARNASON, A. N. A general methodology for the analysis of capture-recapture experiments in open populations. **Biometrics**. v. 52, p. 860-73, 1996.

SESSEGOLO, G. C.; ROCHA, L. F. S; THEULEN, V. **Cavernas do Paraná: dez anos de espeleologia**. Curitiba: GEEP-Açungui, 34 f., 1996.

SESSEGOLO, G. C.; ROCHA, L. F. S.; LIMA, F. F. **Conhecendo cavernas: Região Metropolitana de Curitiba**. Curitiba: GEEP-Açungui, 106 f., 2006.

THOMAS, D. W.; LAVAL, R. K. Survey and census methods. *In: Ecological and behavioral methods for the study of bats*. KUNZ, T. H. (Ed). Washington DC, United States: Smithsonian Institution Press, p. 77-89, 1988.

TRAJANO, E. **Padrões de distribuição e movimentos de morcegos cavernícolas no Vale do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo**. 187 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981.

_____. Protecting caves for the bats or bats for the caves? **Chiroptera Neotropical**. v. 1, n. 2, 1995

_____. Cave Faunas in Atlantic Tropical Rain Forest: Composition, Ecology, and Conservation. **Biotropica**. v. 32, n.4, p. 882-893, 2000.

TURNER, D. C. **The Vampire Bat: a field study in behavior and ecology**. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 145 f., 1975.

UEDA, W. Período de atividade alimentar e tipos de presas de morcegos hematófagos (Phyllostomidae) no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 52, n. 4, p. 563-573, 1992.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. Chave para a identificação de quirópteros brasileiros. **Boletim de Ciências, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras**. São José do Rio Preto, 73 f., 1973.

WILKINSON, G. S. The social organization of the common vampire bat. II. Mating system, genetic structure, and relatedness. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 17, p. 123-134, 1985.

_____. Social Organization and Behavior, *In: Natural History of Vampire Bats*. GREENHALL, A.M. & SCHMIDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press. p.85-95, 1988.

_____. Food sharing in vampire bats. **Scientific American**. v. 262, n. 2, p. 64-70, 1990.

Capítulo 3: Ecologia Molecular de *Desmodus rotundus* no Parque Estadual de Campinhos,
Paraná, Brasil.



À Natureza...

Afogado em sua exuberância e cumplicidade, por vezes sacrifiquei alguns de seus menores e mais inofensivos filhos; prometo-te que estes não se foram em vão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	66
ABSTRACT	67
1 INTRODUÇÃO	68
1.1 A GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO.....	68
1.1.1 A DIVERSIDADE GENÉTICA.....	68
1.1.2 ANÁLISE DE ESTRUTURAS FAMILIARES E PARENTESCO	70
1.1.3 TAMANHO EFETIVO DA POPULAÇÃO	70
1.2 MARCADORES MOLECULARES	71
1.2.1 A <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> (PCR)	72
1.2.2 MICROSSATÉLITES	72
1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MORCEGO-VAMPIRO-COMUM (<i>DESMODUS ROTUNDUS</i>).....	73
1.4 CONSEQUÊNCIAS GENÉTICAS DA POLIGINIA EM OUTROS MORCEGOS	76
2 JUSTIFICATIVA	78
3 OBJETIVOS	79
4 MATERIAL E MÉTODOS	80
4.1 ÁREA DE ESTUDO	80
4.2 METODOLOGIA APLICADA EM CAMPO	81
4.2.1 SESSÕES DE CAPTURA E TRIAGEM	81
4.2.2 COLETA E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	82
4.3 METODOLOGIA APLICADA EM LABORATÓRIO	84
4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA	84
4.3.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE MICROSSATÉLITES	84
4.3.3 SEQÜENCIAMENTO DAS REGIÕES REPETITIVAS (MICROSSATÉLITES).....	85
4.4 ANÁLISE DOS DADOS.....	85
4.4.1 ALINHAMENTO	85
4.4.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE ALÉLICA	86
4.4.3 ANÁLISE DE PARENTESCO	87
4.4.4 DISTRIBUIÇÃO DO SUCESSO REPRODUTIVO EM MACHOS	87
4.4.5 ANÁLISE DO TAMANHO EFETIVO DA POPULAÇÃO.....	87
5 RESULTADOS.....	88
5.1 METODOLOGIA APLICADA EM CAMPO	88
5.2 METODOLOGIA APLICADA EM LABORATÓRIO	88
5.3 ANÁLISE DOS DADOS.....	89
6 DISCUSSÃO	94
6.1 METODOLOGIA APLICADA EM CAMPO	94
6.2 METODOLOGIA APLICADA EM LABORATÓRIO	94
6.3 ANÁLISE DOS DADOS.....	95
7 CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS	99

RESUMO

Mesmo sendo uma das espécies de morcegos mais bem conhecidas, há escassas investigações acerca da variabilidade genética intraespecífica de *Desmodus rotundus*. Além disso, o sistema reprodutivo com a formação de haréns pode promover maiores taxas de endocruzamento e estruturação genética em populações com gerações sobrepostas. Para tanto, este estudo tem como objetivo investigar a diversidade genética existente em uma população do morcego-vampiro-comum *Desmodus rotundus*, a partir do uso de marcadores moleculares (oito *loci* de microssatélites) a fim de se avaliar os níveis de variabilidade intraespecífica, além de inferir o grau de assimetria reprodutiva na população local e o tamanho efetivo da população (N_e). As coletas foram realizadas de Junho/09 a Março/10, no fragmento de floresta ombrófila mista do Parque Estadual de Campinhos, Paraná, Brasil. Foram encontrados, a partir de amostras biológicas de sangue e tecido, 35 alelos de microssatélites em 49 indivíduos (36 machos e 13 fêmeas) genotipados, sendo Dero_D02F o *locus* mais polimórfico (6 alelos diferentes) e o Dero_B11F o menos polimórfico (2 alelos). Apenas o *locus* Dero_D02F apresentou desvios significativos entre a proporção de heterozigosidades observada ($H_o = 0.091$) e esperada ($H_e = 0.680$). Houve diferenças nas frequências alélicas entre os sexos. A presença de alelos homozigotos em adultos foi ligeiramente maior do que em jovens, sugerindo que a taxa de endogamia não sofreu fortes discrepâncias ao longo do tempo entre estas gerações. Já a presença de homozigotos encontrada ser maior em fêmeas do que em machos demonstra assimetria alélica na população, corroborando com a idéia de filopatria de fêmeas. Quanto à análise de parentesco no programa COLONY, dois irmãos de pai e mãe foram encontrados em duas ocasiões ($p \approx 1$) e em outras duas ocasiões ($1 < p < 0.80$). Quatro irmãos de pai e mãe: em apenas uma ocasião, com $p \approx 1$. E cinco irmãos de pai e mãe: em apenas uma ocasião, com $p \approx 1$. Quatro descendentes tiveram pai e mãe encontrados, isto é, genotipados, e mais outros quatro foram inferidos como filhos de mesma mãe. Seis agrupamentos distintos foram inferidos de acordo com a similaridade alélica dos indivíduos capturados, sugerindo que há alto grau de parentesco entre 23 dos 49 indivíduos genotipados neste estudo. O sucesso reprodutivo apontou que dos 16 machos adultos genotipados, apenas dois indivíduos foram inferidos como pais dos 25 jovens. Foram encontrados apenas nove indivíduos distintos da população de *D. rotundus* que contribuem para o aporte de diversidade alélica na prole das próximas gerações. A estimativa de N_e , associada aos efeitos e da frequência de eventos de controle populacional indiscriminados, são de preocupação para a sobrevivência de populações de *Desmodus rotundus*. Portanto, devem ser levados em consideração em futuras tentativas de conservação e proteção ao longo de toda a distribuição da espécie, antes mesmo que estas populações estejam ameaçadas.

Palavras-chave: Biologia Reprodutiva. Microssatélites. Diversidade alélica. Tamanho efetivo da população.

ABSTRACT

Despite being one of the bat species most well known, there is scant research about the genetic variability among individuals of *Desmodus rotundus*. Furthermore, the reproductive system with the formation of harems may promote higher rates of inbreeding and genetic structure in populations with overlapping generations. Therefore, this study aims to investigate the genetic diversity within a population of vampire bat *Desmodus rotundus* commonplace, from the use of molecular markers (eight microsatellite *loci*) in order to assess levels of intraspecific variability, and to infer the degree of asymmetry in the reproductive population and the local effective population size (N_e). Samples were collected from Jun/09 to Mar/10 in Araucaria forest fragment of Campinhos State Park, Paraná, Brazil. We found, from biological samples of blood and tissue, 35 microsatellite alleles in 49 individuals (36 males and 13 females) were genotyped, and Dero_D02F most polymorphic *locus* (6 different alleles) and Dero_B11F less polymorphic (2 alleles). Only Dero_D02F *locus* showed significant variation in the proportion of observed heterozygosity ($H_o = 0.091$) and expected ($H_e = 0.680$). We found differences in allele frequencies between sexes. The presence of homozygous alleles was slightly higher in adults than in younger people, suggesting that the rate of inbreeding suffered no strong differences over time between these generations. The presence of homozygotes found to be greater in females than in males shows allelic imbalance in the population, supporting the idea of female philopatry. The analysis of kinship in the program COLONY, two brothers from his father and mother were found on two occasions ($p \approx 1$) and on two other occasions ($1 < p < 0.80$). Four brothers of father and mother: in only one occasion, with $p \approx 1$. Five brothers and father and mother: in only one occasion, with $p \approx 1$. Four descendants had found his father and mother, ie, genotyped, and four other were inferred as children of the same mother. Six distinct clusters were inferred according to allelic similarity of individuals caught, suggesting that there is a high degree of relationship between 23 of the 49 individuals genotyped in this study. Breeding success showed that the 16 genotyped adult males, only two individuals were inferred as the parents of 25 young people. We found only nine distinct individuals of the population of *D. rotundus* contributing to the contribution of allelic diversity in the offspring of the next generations. The estimate of N_e , associated with the effects and frequency of events indiscriminate population control are of concern for the survival of populations of *Desmodus rotundus*. Therefore they should be taken into account in future attempts at conservation and protection throughout the distribution of species, even before these populations are threatened.

Keywords: Reproductive Biology. Microsatellites. Allelic diversity. Effective population size

1 INTRODUÇÃO

1.1 A GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO

Durante muito tempo a maneira tradicional de observação da natureza esteve limitada a estudos comparativos da morfologia e ecologia. Porém, com o advento de novas técnicas na Genética e na Biologia Molecular, uma nova e rica fonte de caracteres está sendo descoberta. O maior problema ainda é a escassez de dados genéticos e moleculares para a grande maioria dos táxons conhecidos. (GARRAFFONI & NEGRELLO-FILHO, 2006; SUNNUCKS, 2000)

A Genética da Conservação baseia-se em dados moleculares e na genética de populações para a investigação científica do *status* de conservação de espécies e/ou populações. Essa se torna uma ferramenta importante na determinação de “o que”, “onde” e “como” conservar a maior diversidade genética com o objetivo de manter o potencial evolutivo de uma espécie ou população e dos ambientes nos quais estes processos evolutivos ocorrem (SCHONEWALD-COX *et al.*, 1983; AVISE, 1994; PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2004; FRANKHAM *et al.*, 2007).

Além disso, atualmente, a Genética da Conservação está sendo amplamente aplicada em estudos de estimativa do impacto antropogênico nas populações naturais, na resolução de problemas taxonômicos, na análise forense, em animais ameaçados de extinção, de difícil captura, de interesse econômico e outras aplicações (CAUGHLEY & GUNN, 1996; SOLÉ-CAVA, 2004; JANEČKA *et al.*, 2007). Ainda, as principais preocupações da Genética da Conservação são a perda da diversidade genética, os impactos deletérios do pequeno tamanho populacional e da fragmentação populacional nas espécies ameaçadas (CAUGHLEY & GUNN, 1996; FRANKHAM *et al.*, 2007).

1.1.1 A DIVERSIDADE GENÉTICA

Os genes são seqüências de nucleotídeos em uma determinada região (*locus*) de uma molécula de DNA. A diversidade genética ou biodiversidade molecular representa seqüências ligeiramente diferentes, apresentando alelos diferentes em um mesmo *locus* em cromossomos homólogos (AVISE, 1994). A diversidade genética também é a manifestação de diferentes características, ou seja, é a diversidade de alelos e genótipos presentes em um grupo (população ou espécie) (FRANKHAM *et al.*, 2002). É a matéria-prima da evolução, sendo

através dela que a seleção natural atua, gerando novas formas adaptativas (DOBZHANSKY *et al.*, 1977).

Por isso, a diversidade genética é uma importante ferramenta para investigação da evolução; verificação das relações filogenéticas, dos limites entre as espécies (diferenciação taxonômica) e da filogeografia. Além de detectar modos de reprodução, hibridização, estrutura familiar e paternidade; avaliar o tamanho da população e o endocruzamento; estimar o tamanho efetivo da população e os níveis de migração e dispersão nas populações; detectar doenças e mutações deletérias; caracterizar a dieta e; até mesmo, ajudar na identificação de espécies através de materiais biológicos (como conteúdo estomacal, peles, pêlos, fezes). (AVISE, 1994; KOCHER & WHITE, 1992; KOHN & WAYNE, 1997; ERNEST *et al.*, 2000; MILLS *et al.*, 2000; CONSTABLE *et al.*, 2001; MORIN *et al.*, 2001; FRANKHAM *et al.*, 2002, 2007; CREEL *et al.*, 2003; RIDDLE *et al.*, 2003; MCKELVEY & SCHWARTZ, 2004; MCKELVEY *et al.*, 2006; BROQUET *et al.*, 2007)

No entanto, a diversidade genética está sendo degradada devido às consequências diretas e indiretas das atividades humanas, que reduzem o tamanho das populações e os fatores evolutivos a que estão sujeitos (DOBZHANSKY *et al.*, 1977). E isto pode aumentar a suscetibilidade de algumas populações à extinção (FRANKHAM *et al.*, 2002).

A deriva genética (mudanças aleatórias das frequências alélicas entre gerações) e o endocruzamento (cruzamento entre aparentados) constituem dois processos fundamentais para a Genética da Conservação, pois podem causar a perda da variabilidade genética principalmente em populações isoladas e de tamanho reduzido. Portanto, deriva e endocruzamento são capazes de gerar impactos importantes sobre a evolução destas populações (LACY, 1997; AMOS & BALMORD, 2001). Além disso, o excesso de endocruzamento dentro de uma população pode levar ao fenômeno da depressão endogâmica, uma vez que aumenta a frequência de homozigotos para alelos deletérios recessivos. Ou seja, o excesso de endocruzamento expressa simultaneamente os vários impactos no valor adaptativo das espécies ou populações provocados pelo endocruzamento e a existência de uma vantagem adaptativa dos heterozigotos sobre os homozigotos, que por sua vez acarretam em altas taxas de mortalidade, a baixa fecundidade, a reduzida habilidade de acasalamento, o crescimento lento, o desenvolvimento e grande suscetibilidade a doenças (RALLS *et al.*, 1988; LACY, 1997; TABERLET, 1997; CRNOKRAK & ROFF, 1999; AMOS & BALMORD, 2001; GRATIVOL *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2001; KELLER & WALLER, 2002; CHARLESWORTH & WILLIS, 2009).

Um detalhe importante é que a relação de Hardy-Weinberg entre frequências alélicas e genotípicas, embora se mantenham constantes dentro de cada subpopulação separadamente, não são mantidas caso as subpopulações forem consideradas em conjunto como uma única população. Este efeito, chamado de “Efeito Wahlund”, causa dificuldade em relacionar as frequências alélicas e genotípicas em populações naturais (FRANKHAM *et al.*, 2002). Isto porque elas frequentemente são mais ou menos subdivididas e o grau de subdivisão é raramente conhecido.

As populações naturais não costumam apresentar panmixia, ou seja, a probabilidade de cruzamento entre dois indivíduos quaisquer não é sempre a mesma, dependendo de fatores biológicos e geográficos. Esta ausência de panmixia, frequentemente, determina uma variabilidade genética não uniformemente distribuída, como, por exemplo, assimetria na capacidade de deslocamento dos adultos, seleção de habitat, cruzamento com escolha de parceiro, distância e barreiras geográficas (WRIGHT, 1969; SLATKIN, 1994).

1.1.2 ANÁLISE DE ESTRUTURAS FAMILIARES E PARENTESCO

Os estudos moleculares podem auxiliar no esclarecimento de vários aspectos da biologia reprodutiva das espécies, como a definição do sucesso reprodutivo em machos e fêmeas e dos sistemas e estratégias de acasalamento (CONRAD *et al.*, 2001; CONSTABLE *et al.*, 2001; DAVIS *et al.*, 2001; GARNIER *et al.*, 2001). Dentre estes, os estudos das relações de parentesco e estruturas sociais frequentemente geram informações preciosas sobre a biologia e história natural das espécies (AVISE, 1994). A análise de paternidade é o tipo mais comum de análise de parentesco, sendo convencionalmente realizada através da análise dos genótipos de uma amostra de mães, seus filhos conhecidos e, utopicamente, todos os pais candidatos plausíveis (FRANKHAM *et al.*, 2002).

1.1.3 TAMANHO EFETIVO DA POPULAÇÃO

Os diversos fatores que causam a diminuição no tamanho da população (censo ou N) acarretam numa diminuição do tamanho efetivo da população. Aliás, todas as consequências genéticas adversas do pequeno tamanho populacional dependem do tamanho efetivo da população, e não do número absoluto de indivíduos (censo) (SHRIMPTON & HEATH, 2003). O tamanho efetivo da população (N_e) é o número de indivíduos que podem ser considerado para

calcular a heterozigosidade de uma população (CROW & KIMURA, 1970). Este N_e é importante porque determina as taxas de perda de variação genética, fixação de alelos deletérios e endogamia (WRIGHT, 1969). Aliás, N_e é na maioria das vezes significativamente menor que o censo, sendo, em média, 11% deste em populações não manejadas (FRANKHAM, 1995). Além disso, em muitas populações naturais há proporção sexual desigual, o que reduz ainda mais o N_e em direção ao número do sexo com menos indivíduos reproduzindo (FRANKHAM, 1995).

Várias são as causas naturais ou antropogênicas responsáveis pelas reduções do tamanho efetivo da população de diversas espécies (PECHMANN *et al.*, 1991; PACKER *et al.*, 1991; FRANKHAM *et al.*, 2002). E conseqüências disto, atualmente os estudos para detectar estas reduções têm sido cada vez mais freqüentes (CORNUET & LUIKART, 1996; BAULLOUX, & LUGON-MOULIN, 2002). Populações cujo N_e está sendo reduzido são mais suscetíveis a apresentar aumento da identidade por prole, efeito da deriva genética sobre o tamanho e a composição da população (LANDE, 1988), além da já citada perda da diversidade genética e suas conseqüências. Schwartz *et al.* (1998) relatam três métodos analíticos utilizados para a estimativa de N_e a partir de dados genéticos: desequilíbrio gamético, excesso de heterozigotos e a mudança temporal. Cada um destes dados é obtido a partir de freqüências alélicas, as quais são transformadas em estimativas de N_e .

O desequilíbrio gamético (D), também conhecido como desequilíbrio de ligação é simplesmente a associação não-aleatória de alelos em *loci* diferentes. O D pode ser gerado por vários fatores, incluindo a seleção natural (VRIJENHOEK, PFEILER & WETHERINGTON, 1992), a hibridação ou mistura de grupos de genes diferentes (FORBES & ALLENDORF, 1991), e deriva genética (WAPLES, 1991). A validade desse pressuposto dependerá de fatores tais como o número de *loci* utilizados, número de cromossomos e o potencial de hibridização, e deve ser cuidadosamente considerado para cada população, principalmente em pequenas populações (HILL, 1981; WAPLES, 1991).

1.2 MARCADORES MOLECULARES

A Genética Molecular tem proporcionado numerosas técnicas de acesso à variabilidade dentro e entre populações, tanto através de polimorfismos de proteínas quanto de DNA (AVISE, 1994). Para obtenção destes dados, são utilizados marcadores moleculares. Estes são fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos, grupos de indivíduos e

espécies geneticamente distintos, ou seja, comportam o acesso à diversidade molecular (AVISE, 1994; BORÉM & SANTOS, 2002; SOLÉ-CAVA, 2004).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados estão: alozimas, PCR, RFLP, RAPD, microssatélites, minissatélites, sequenciamento de DNA e SNP. A escolha daquele que será usado depende de vários fatores, como o problema no qual se pretende investigar, tipo de material biológico, investimento financeiro etc.

1.2.1 A *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifica um fragmento específico de DNA, permitindo que se tenham milhares ou milhões de cópias do fragmento desejado da sequência de DNA original (PALUMBI, 1996). Na prática, cerca de 25 ciclos de reação são necessários para a amplificação efetiva do DNA, por isso o termo “reação em cadeia” (ALBERTS *et al.*, 2004; MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2004). É um método altamente sensível capaz de obter resultados rapidamente (NAVIDI *et al.*, 1992), apresenta três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão. Após ser amplificado, o DNA é extraído e adicionado a uma reação contendo todos os reagentes necessários. Incluem-se: *primers*, *Taq* polimerase (enzima resistente a altas temperaturas), solução tampão e magnésio (ERLICH, 1992; FRANKHAM *et al.*, 2002, 2007). O par de *primers* escolhido irá limitar o início e o final da amplificação no fragmento desejado (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

1.2.2 MICROSSATÉLITES

Os marcadores moleculares mais utilizados ultimamente em estudos de diversidade genética e estrutura populacional são microssatélites, os quais estão incluídos dentro das sequências de DNA nuclear denominadas de *Simple Sequence Repeats* (SSRs), (KASHI *et al.*, 1997) ou *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs) (MURRAY, 1996). Estas sequências consistem de segmentos de DNA com unidades repetitivas (1 a 6 pares de bases) organizadas lado a lado (BRUFORD & WAYNE, 1993; MURRAY, 1996).

Os microssatélites possuem *loci* altamente polimórficos, com alelos codominantes e de herança Mendeliana, encontrando-se amplamente dispersos em genomas eucarióticos e podendo ocorrer também em genomas procarióticos sob baixas frequências (LITT & LUTY, 1989; SCHLÖTTERER, 1998). As mutações ocorridas nestes marcadores são decorridas

principalmente das alterações no número de repetições, causadas por erros de pareamento devido ao deslizamento das fitas no momento da replicação, num mecanismo de mutação intramolecular chamado de *DNA slippage* (TAUTZ, 1993). Estes erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições que conferem o caráter altamente polimórfico destes locos. Sendo, assim, acumuladas em taxas relativamente constantes. Em mamíferos, estima-se que as repetições mais comuns (GT/AC) ocorram a cada 30 mil bases, em média (SCHLÖTTERER, 1998).

Além do alto nível de polimorfismo e alta taxa de mutação, estes *loci* geralmente apresentam-se seletivamente neutros, obedecendo aos vários dos pressupostos usualmente utilizados em genética de populações (MURRAY, 1996). Por apresentarem alelos de tamanho pequeno, permitem a utilização de DNA altamente fragmentado ou em pequenas quantidades (BRUFORD & WAYNE, 1993, WRIGHT & BENTZEN, 1994; BENNETT *et al.*, 1998). Sendo que a maioria dos microssatélites encontra-se em simples cópia, facilitando a identificação dos alelos sem ambigüidade (SCHLÖTTERER, 1998). Além disso, permitem superar as limitas das outras técnicas (JARNE & LAGODA, 1996), uma vez que apresentam estes altos níveis de variabilidade em estado diplóide (TAUTZ, 1993).

Essas características apresentadas por estes *loci* permitem sua utilização em uma ampla variedade de estudos para a avaliação da diversidade genética em nível populacional e individual, como a identificação de indivíduos ou espécies (ERNEST *et al.*, 2000), a comparação da variabilidade genética entre espécies e populações, relações filogenéticas (JOHNSON *et al.*, 1999), no grau de estrutura das populações e história evolutiva (CIOFI & BRUFORD, 1999; WAITS *et al.*, 2000) e na determinação de parentesco e estruturas sociais (AVISE, 1994; MORIN *et al.*, 1994; NESJE *et al.*, 2000).

1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MORCEGO-VAMPIRO-COMUM (*DESMODUS ROTUNDUS*)

O morcego-vampiro-comum *Desmodus rotundus* é um filostomídeo de ampla distribuição, ocorrendo do México ao Uruguai (GREENHALL *et al.*, 1983; BREDT *et al.*, 1999). No Brasil, pode-se dividir esta distribuição em quatro clados geograficamente descritos, suportados por análises filogenéticas, moleculares e estatísticas: Região Norte da Floresta Atlântica, Região Sul da Floresta Atlântica, Cerrado e Pantanal (MARTINS *et al.*, 2007). É considerada uma espécie abundante (ARITA, 1993); sendo que, para Turner (1975), as populações de *D. rotundus* parecem aumentar em habitats impactados.

Todos os integrantes da Subfamília Desmodontinae (Phyllostomidae, Chiroptera) só se alimentam de sangue durante a fase adulta e não conseguem sobreviver mais de três dias sem ele (FREITAS, 2000). Vários autores registraram os tipos de presa comumente utilizadas pelos morcego-vampiro-comum, sendo que a maioria deles mostra preferência por mamíferos de médio e grande porte (VILLA-R., 1966; TURNER, 1975; SCHMIDT, 1995; KUNZ & FENTON, 2005; BOBROWIEC, 2007). Mas quando os animais domésticos são mantidos próximos à residência do proprietário, os seres humanos podem, eventualmente, ser atacados por *D. rotundus*, como vem acontecendo principalmente em algumas localidades do Norte do Brasil (BREDT *et al.*, 1998; MAYEN, 2003).

Além do apêndice nasal em formato de ferradura, possui pelagem brilhante de coloração acinzentada, longo polegar com três calosidades e lábio inferior sulcado. Apresenta: porte médio, entre 25 e 40 g de massa corpórea, antebraço de 52 a 60 mm e fórmula dentária: i 1/2, c 1/1, pm 1/2, m 1/1 = 20 (VIZOTTO & TADDEI, 1973; GREENHALL *et al.*, 1983; BREDT, 1998). Em virtude do hábito hematófago, possui estômago e rins especializados na absorção e processamento do plasma sanguíneo (BRASS, 1994; BERNARD, 2005; KUNZ & FENTON, 2005).

Estes morcegos utilizam cavernas, ocos de árvores e fissuras em rochas como abrigos diurnos (CRESPO *et al.*, 1961; GREENHALL *et al.*, 1983). E embora não seja um fato comum, já foram registradas colônias com mais de 100 indivíduos (UIEDA *et al.*, 1996) e cerca de 300 indivíduos (SAZIMA, 1978; TADDEI *et al.*, 1991; BREDT *et al.*, 1998).

Desmodus rotundus geralmente forrageiam pouco se comparado a outros morcegos, sendo uma área entre 3 a 8 km ao redor do abrigo (FLEMING *et al.*, 1972; CRESPO *et al.*, 1972; GREENHALL *et al.*, 1983). O padrão de atividade inicia-se nas primeiras horas da noite, com pico de atividade na segunda hora da noite (MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1989). São capazes de voar à sombra da copa das árvores (MITCHELL *et al.*, 1973) e portanto podem ser encontrados independentemente das fases da lua (LAVAL, 1970). Da mesma forma, são encontrados em todos os meses do ano, inclusive em noites frias, sendo que não há indícios de migrações estacionais, hibernação ou estivação (CRESPO *et al.*, 1961; WIMSATT, 1962; UIEDA, 1982; GREENHALL *et al.*, 1983).

A umidade relativa do ar pode influenciar na escolha do abrigo diurno de *D. rotundus* (VILLA-R., 1966; MCFARLAND & WIMSATT, 1969; TRAJANO, 1981), por isso as cavernas tornam-se locais adequados, uma vez que a umidade é sempre superior à 50% e a temperatura é amena. Esta preferência de abrigo ocorre provavelmente porque há uma alta taxa de perda de água no morcego-vampiro por evaporação durante o dia (MCFARLAND & WIMSATT, 1969; MCNAB, 1973).

A unidade social primária da colônia de *D. rotundus* é o agrupamento de fêmeas. A organização social é do tipo hierarquia de dominância, com pequenos haréns onde um macho dominante se sobressai sobre um agrupamento de oito a doze fêmeas e seus filhotes (num total de até 50 indivíduos, geralmente), sendo que estas fêmeas e filhotes permanecem em constantes interações sociais e contato corporal (GREENHALL *et al.*, 1983; WILKINSON, 1990). As fêmeas, assim que nascem, são recrutadas pelo macho dominante e são responsáveis, quando adultas, por amamentar, proteger e ensinar seus próprios filhotes e também regurgitar sangue para outros membros da colônia (WILKINSON, 1985; KUNZ & PIERSON, 1994). No entanto, Wilkinson (1985) acredita que provavelmente os machos adultos competem principalmente pelo acesso e defesa do abrigo que já contém algumas fêmeas agrupadas, ou invés de forçar fêmeas para si.

Os filhotes machos, à medida que se tornem adultos, são expulsos do grupo pelo macho dominante, sendo obrigados a dispersar. Wilkinson (1984), na Costa Rica, observou que todos os machos que nasciam deixaram o grupo natal após completar um ano de idade. Os machos solteiros formam pequenos agrupamentos que podem permanecer próximos do harém à espera de uma oportunidade de ocupar o posto de macho dominante. Podem, também, sair e ir procurar outros locais para constituir seu próprio harém. (WILKINSON, 1990; BREDT *et al.*, 1998). Embora as fêmeas dêem preferência aos machos de hierarquia superior, Wilkinson (1985) obteve uma média máxima de paternidade para o macho dominante de apenas 46%. Assim, o sucesso de acasalamento aleatório dos machos não-dominantes é fundamental para a variabilidade genética da espécie.

Ocorre um filhote por gestação sendo que os nascimentos não são sazonais, ocorrendo durante todo o ano (padrão poliétrico) (GREENHALL *et al.*, 1983; O' BRIEN, 1993), uma vez que a disponibilidade de alimento é constante em relação à sazonalidade (SCHMIDT, 1988). Entretanto, há picos de nascimentos em diferentes épocas do ano, com uma possível sincronia da atividade sexual nestes períodos.

Há muitos anos os morcegos hematófagos têm sido alvo de autoridades científicas e governamentais, devido ao fato de serem vetores de doenças de animais domésticos e de criação, provocando perdas econômicas (MITCHELL *et. al.*, 1972; ACHA & MÁLAGA-ALBA, 1988), pois diminuem a qualidade do couro e causam enfraquecimento e perda de peso do gado, infecções de microorganismos (bactérias, fungos e vírus) e miíases nos ferimentos (CONSTANTINE, 1970; 1988; GITTI, 2007). É uma espécie de comportamento versátil (SAZIMA, 1978), a qual foi a mais favorecida pela introdução de animais domésticos e de criação na região neotropical a partir do século XVI, sendo considerada, uma “praga pecuária

neotropical” (GREENHALL, 1965, 1988; VILLA-R., 1966; GREENHALL, 1974; GONZÁLEZ & MITCHELL, 1976; ACHA & MÁLAGA-ALBA, 1988).

Desmodus rotundus é o principal transmissor de raiva dos animais herbívoros da América Latina, sendo que no Brasil estes prejuízos à criação de animais atingem cerca de trinta milhões de dólares por ano (ACHA & MÁLAGA-ALBA, 1988; BAER, 1991; GREENHALL *et al.*, 1983; BRASS, 1994; UIEDA & DEBERALDINI, 2002), sendo considerado reservatório da doença (KOTAIT, 2002; CALISHER *et al.*, 2006). Isto se deve ao comportamento típico da espécie em possuir intenso contato físico entre os membros do agrupamento por realizarem limpeza mútua e regurgitarem alimento para os outros indivíduos (TURNER, 1975 *apud* LINHART *et al.*, 1972). A presença de indivíduos não-residentes em uma colônia apesar de favorecer a variabilidade genética da população de morcegos, pode também ter um papel importante na propagação da raiva entre agrupamentos de *D. rotundus* (TURNER, 1975). Por estes motivos e por ser abundante e bem distribuído na América Latina, *D. rotundus* é a espécie de morcego melhor estudada e, conseqüentemente, a mais conhecida (UIEDA, 1987).

1.4 CONSEQUÊNCIAS GENÉTICAS DA POLIGINIA EM OUTROS MORCEGOS

A partição da diversidade genética dentre e entre os diferentes níveis hierárquicos da estrutura populacional influenciam o tamanho efetivo da população (NUNNEY, 1999). A subdivisão populacional em grupos de parentesco coeso influencia nas taxas de endocruzamento e deriva genética, tendo implicações importantes para o comportamento social. Alguma forma de subdivisão é necessária para a propagação inicial e manutenção das unidades socialmente definidas e da evolução do comportamento altruísta e cooperativo (ALTMANN, 1979).

McCracken & Bradbury (1977, 1981) estudaram os haréns de *Phyllostomus hastatus* (Chiroptera, Phyllostomidae) em Trinidad. Utilizando dados de alozimas unidos às observações em campo, eles concluíram que os juvenis não são recrutados no agrupamento social de nascimento, o que permite uma maior variabilidade genética dentro do agrupamento do que se esperava para um sistema poligínico coeso.

Storz *et al.* (2001) analisou 10 *loci* de microssatélites de 431 indivíduos de *Cynopterus sphinx* (Chiroptera, Pteropodidae) na Índia, entre 1996 e 1998. Estes morcegos costumam formar haréns de cerca de 37 fêmeas e seus filhotes. Com métodos de marcação-recaptura, Storz *et al.* (2000) registrou indícios de formação de novos haréns a partir da cisão de haréns

anteriormente coesos. Ao tratar separadamente as gerações dentro dos haréns utilizando o programa KINSHIP, foram encontrados contrastes na estruturação genética entre consecutivas gerações de descendentes e entre as gerações. Apesar dos elevados níveis de parentesco paternal entre os filhos e o baixo grau de parentesco entre as fêmeas do harém, os autores acreditam ser reflexo da baixa sobrevivência de juvenis e da alta taxa de dispersão após o nascimento. Assim, a seleção de parentesco é uma provável explicação para a formação e manutenção deste comportamento de grupos coesos poligínicos na espécie analisada.

2 JUSTIFICATIVA

Diante da acuidade da diversidade genética para as espécies e/ou populações e as possíveis consequências de alterações em seus padrões naturais, estudos genéticos neste âmbito que envolvam a caracterização dos níveis de variabilidade genética dentro das populações e espécies são de suma importância. Contudo, comparando com outros grupos de vertebrados, a análise molecular acerca dos morcegos ainda é bem escassa.

A tradicional metodologia de marcação-recaptura utilizada por vários autores sugere que *D. rotundus* ocupa vários abrigos, mas mostra forte fidelidade a esses abrigos, resultando em uma colônia estável quanto à composição dos indivíduos. De acordo com Pedro & Taddei (1997), uma alta taxa de recaptura sugere uma restrita área de alimentação e fidelidade de forrageamento nestes locais. No entanto, há escassas investigações acerca da variabilidade genética intraespecífica, sendo que inexistem investigações robustas sobre os graus de parentesco e tamanho efetivo da população numa população de *D. rotundus* com uso de ferramentas moleculares. Além disso, o sistema reprodutivo com a formação de haréns pode promover maiores taxas de endocruzamento e estruturação genética em populações com gerações sobrepostas. Esse sistema reprodutivo, ainda, acarreta em menor tamanho efetivo da população (N_e), uma vez que muitos machos têm pouco ou nenhum aporte genético para a próxima geração, ou seja, poucos irão contribuir para a diversidade genética da população. Portanto a detecção de um N_e é veemente, sendo necessária para evitar a ameaça da população ou extinção local.

3 OBJETIVOS

(1) Investigar a diversidade genética existente em uma população do morcego-vampiro-comum *Desmodus rotundus*, a partir do uso de marcadores moleculares (oito *loci* de microssatélites) a fim de se avaliar os níveis de variabilidade intraespecífica.

(2) Comparar a diversidade genética entre jovens e adultos para inferir o grau de assimetria reprodutiva na população local. Além de verificar o sucesso reprodutivo em machos numa espécie cujo sistema de acasalamento se dá através da formação de haréns.

(3) Comparar nesta população a relação entre o tamanho de censo (N) e o tamanho efetivo populacional (N_e) com base em genética de populações.

(4) Detectar os prováveis graus de parentesco entre os indivíduos da população amostrada.

(5) Relacionar os resultados com informações disponíveis sobre a biologia desta espécie, a fim de contribuir para a elaboração de futuras estratégias de controle populacional adequadas, com respaldos que visem à conservação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

Para a escolha do local de estudo, a partir do proposto por Turner (1975), foram considerados principalmente: a presença e a abundância de animais de criação (gado, porco, cavalo, galinha, etc) nas proximidades; a presença e a abundância de *D. rotundus*; e a presença de remanescentes florestais com potenciais hospedeiros selvagens. Além disso, Arnone & Passos (2007) capturaram 274 indivíduos de *D. rotundus*, correspondendo a mais de 64% das capturas para a área de estudo.

As coletas foram realizadas no Parque Estadual de Campinhos (PEC) (25°02' S e 49°05' W) (**Figura 1**) localizado às margens da Estrada da Ribeira, entre os municípios de Tunas do Paraná e Cerro Azul, Paraná, Brasil. Possui cerca de 580 hectares e 890 metros de altitude e temperatura média anual entre 16°C e 18°C, sendo subtropical úmido mesotérmico do tipo Cfb na classificação de Köppen (PARANÁ, 2003). Este parque foi considerado Unidade de Conservação através do decreto estadual nº 31.013 de 20 de julho de 1960, a fim de proteger o complexo de grutas (Conjunto Fada-Jesuítas) de 1527 metros de desenvolvimento e o remanescente de Floresta com Araucária.

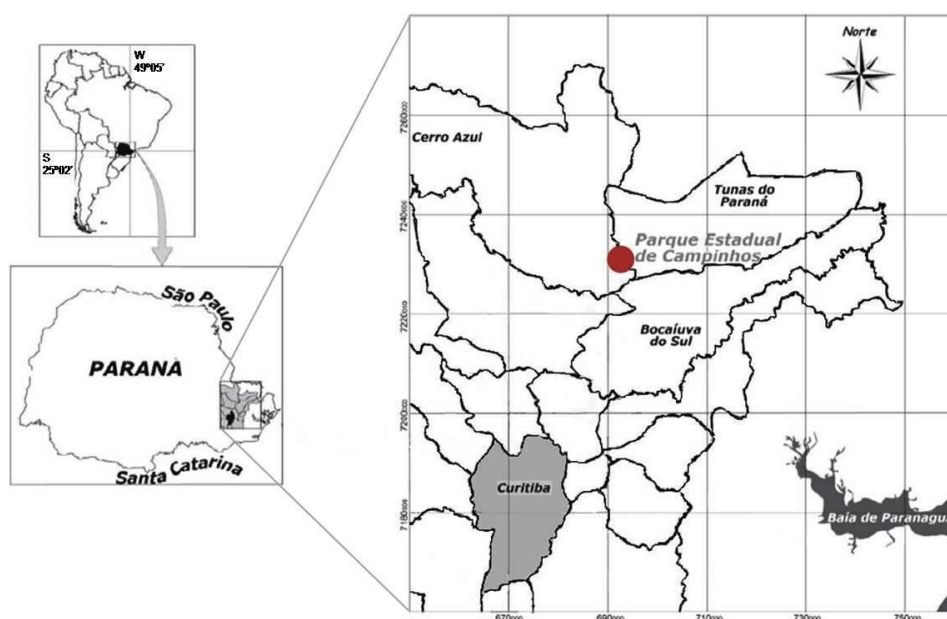


FIGURA 1: MAPA DA LOCALIZAÇÃO DO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS (PEC). Situado na região do Vale do Ribeira, entre os municípios de Tunas do Paraná e Cerro Azul, a 63 km de capital paranaense, Curitiba.
Adaptado de ARNONE & PASSOS (2007).

4.2 METODOLOGIA APLICADA EM CAMPO

4.2.1 SESSÕES DE CAPTURA E TRIAGEM

As sessões de capturas dos morcegos foram iniciadas em Junho/09 e encerradas em Março/10, sendo predominantemente 2 noites consecutivas de coleta por mês. Totalizando, portanto, 9 fases de campo. Restringiu-se às noites com baixa luminosidade, como as de lua nova ou minguante, para maximizar as capturas (CRESPO *et al.*, 1972; CARDOSO *et al.*, 1996; ESBÉRARD, 2007). Foram armadas seis redes de neblina (*mist-nest*) (GREENHALL & PARADISO, 1968) de 2 metros de altura e 7 de comprimento, rentes ao chão, na entrada e no entorno da Gruta da Fada do conjunto de cavernas do PEC, durante todo o período noturno, totalizando um esforço de captura de 180h/rede.

Após a retirada do morcego-vampiro da rede de neblina, estes eram acondicionados em sacos de algodão para o transporte até o local de triagem (**Figura 2**). A identificação individual foi realizada na sequência em que os indivíduos eram capturados em campo, sendo que machos (dir = anilha no antebraço direito) e fêmeas (esq = anilha no antebraço esquerdo) tinham numeração independente entre si. Durante a triagem, além da determinação do sexo dos espécimes de *D. rotundus*, foram também determinadas a condição de desenvolvimento (jovem ou adulto) e a condição reprodutiva em que o indivíduo era capturado (ativos ou inativos, de acordo com as características visíveis externamente) dos indivíduos. A condição ontogenética foi determinada pelo grau de ossificação das epífises dos metacarpos e primeiras falanges das asas (ANTHONY, 1988). No entanto, esta determinação só permite que os indivíduos sejam classificados em jovens e adultos. Logo, indivíduos adultos eram aqueles que apresentavam as epífises totalmente ossificadas. Os indivíduos jovens foram considerados quando as epífises dos ossos longos das asas ainda estavam cartilaginosas, indicando que estavam ainda em fase de crescimento.

A atividade reprodutiva dos machos foi determinada de acordo com a posição dos testículos na bolsa escrotal, sendo que os machos inativos de *D. rotundus* mantêm os testículos na cavidade abdominal. As fêmeas ativas sexualmente foram aquelas encontradas grávidas ou lactantes. A gravidez foi determinada pela apalpação do seu abdômem para detectar a presença de feto. Fêmeas em lactação (lactantes) foram identificadas pela presença de leite em suas mamas, quando comprimidas pelos dedos da pesquisadora. A turgidez e o tamanho da mama foram utilizados para evidenciar se a fêmea já havia tido filhotes (múltipara) ou não (nulípara), no caso de fêmeas inativas.



FIGURA 2: SEQUÊNCIA DA METODOLOGIA UTILIZADA DURANTE AS CAPTURAS. A) Retirada do espécime da rede de neblina; B) Acondicionamento em saco de algodão; C) Tomadas informações reprodutivas e ontogenéticas (nesta considerando o grau de ossificação das epífises dos metacarpos e falanges). Escala: 5 cm.

4.2.2 COLETA E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Recentemente, foi demonstrado que genótipos microssatélites podem ser determinados utilizando amostras não-invasivas, em que o contato direto entre pesquisadores e animais é atenuado, podem fornecer DNA suficiente para a análise genética e demográfica descrita neste estudo (MORIN & WOODRUFF, 1996).

As amostras de sangue foram coletadas utilizando uma agulha de insulina para fazer uma pequena picada na veia de maior calibre da região do propatágio (membrana antebraquial) (**Figura 3A**). Com o auxílio de uma pinça esterilizada e um pedaço (1 cm x 1 cm) de papel filtro do kit Cartão de DNA – Coleta, Armazenamento, Transporte, Preservação e Extração de Material Biológico (MGM[®], Curitiba, Brasil) sendo retirados cerca de 30µL de sangue. Cada amostra de papel filtro embebido de sangue foi mantido seco e separados individualmente em microtubos de 1,5 mL à temperatura ambiente. Quando necessário, uma pequena quantidade de pedra-hume (alumen de K⁺) em pó foi colocada no local para estancar o sangue mais rapidamente e para uma melhor cicatrização.

Já para as amostras de tecido da asa foi retirado um pedaço de cerca de quatro milímetros do dactilopatágio largo (**Figura 3B**). Mantendo o espécime com a asa esticada e com a ajuda de uma pinça de ponta fina esterilizada eram feitos pequenos furos e posteriormente este tecido era cuidadosamente rasgado. Esta metodologia foi desenvolvida como um método alternativo ao uso de *biopsy punch* (WORTHINGTON-WILMER & BARRATT, 1996; WEAVER *et al.*, 2009). As amostras foram colocadas em microtubos de 0,5 mL e conservadas em etanol 96% à temperatura ambiente (SCHWARTZ & PILGRIM, 2006; BEJA-

PEREIRA, 2009). Após alguns poucos dias o local da asa em que o pedaço foi retirado há cicatrização (**Figura 3C**). E após a triagem e coleta das amostras biológicas (sangue e tecido), os morcegos foram liberados (**Figura 3D**).

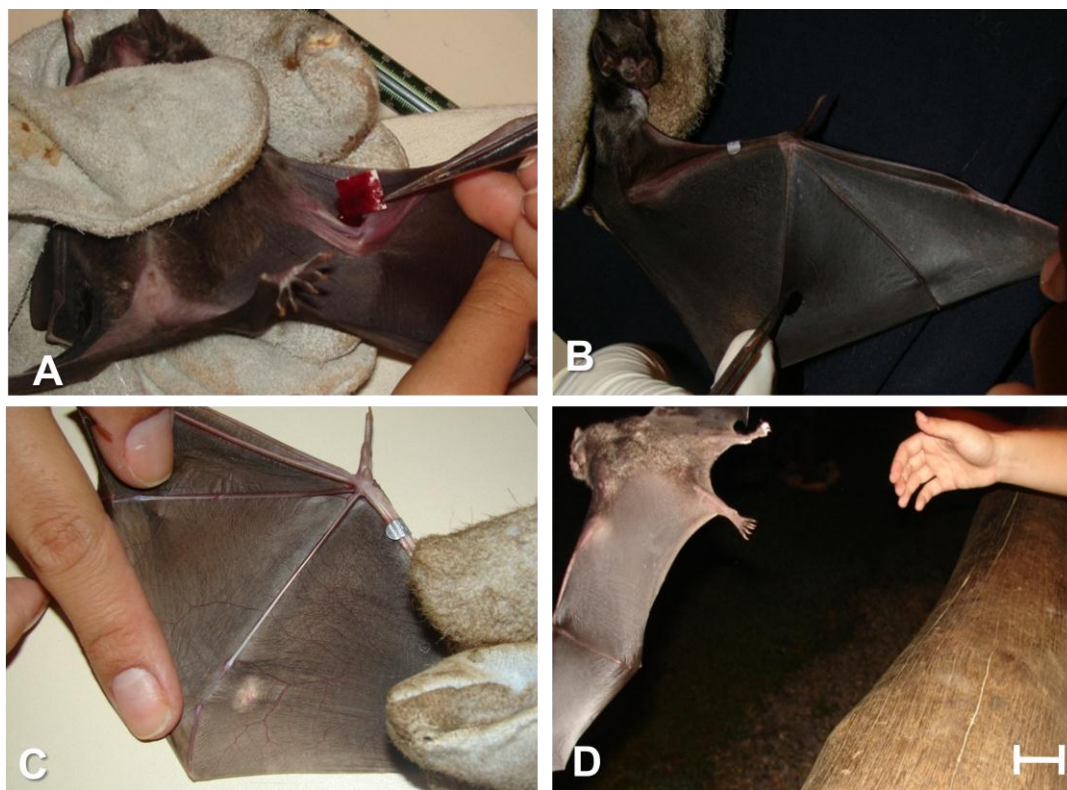


FIGURA 3: SEQUÊNCIA DA METODOLOGIA DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO. A) Amostra de sangue foi coletada da veia de maior calibre da região do propatágio, utilizando uma agulha de insulina, mantendo em papel filtro do kit Cartão de DNA da MGM®; B) Amostra de tecido da asa (pedaço de cerca de 4 mm), retirada com a ajuda de uma pinça de ponta fina esterilizada; C) Evidência de cicatrização da asa de um indivíduo que havia tido um pedaço da asa retirado 30 dias antes. D) Soltura do espécime. Escala: 5 cm.

A captura e coleta dos animais foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através da Licença de Coleta de Material Biológico. Ao passo que a Licença para Desenvolver Projeto na Unidade de Conservação do Paraná foi autorizada pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

4.3 METODOLOGIA APLICADA EM LABORATÓRIO

4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras de tecido da asa de *Desmodus rotundus* utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®, Valencia, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Já o DNA das amostras de sangue foi extraído diretamente do papel filtro presente no kit Cartão de DNA – Coleta, Armazenamento, Transporte, Preservação e Extração de Material Biológico (MGM®, Curitiba, Brasil), seguindo o protocolo e reagentes fornecidos pelo fabricante. A pureza e a concentração do extrato de DNA obtido foram medidos no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (THERMO SCIENTIFIC®, Wilmington, EUA) a partir de 1µL de amostra.

4.3.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE MICROSSATÉLITES

Devido à pequena quantidade de DNA que poderia estar contida nas amostras não-invasivas, foi realizada a amplificação do fragmento de DNA desejado, mediante a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Esta utiliza primers específicos (de 20 a 30 bases) para a amplificação de um determinado segmento de DNA, os quais são complementares a seqüências únicas que, nesse caso, flanqueiam o microsatélite. O DNA genômico extraído das amostras de tecido da asa e sangue teve seus oligonucleotídeos marcados com fluorescência para a reação de PCR para amplificar as regiões microsatélites em termociclador Personal Cycler (EPPENDORFF®, Hamburg, Alemanha).

Distribuídos em 3 conjuntos *multiplex* de iniciadores (I, II e III), os doze *loci* de microsatélite desenvolvidos por Piaggio *et al.* (2008), foram utilizados inicialmente. No entanto, os *loci* referentes ao conjunto II foram pouco informativos para a grande maioria das amostras. Assim, passou-se a utilizar somente os conjuntos I (Dero_D06F, Dero_C12F, Dero_B11F, Dero_B03F e Dero_B10F) e III (Dero_C11F, Dero_D02F, Dero_A08F).

Para o conjunto I de *primers multiplex*, o volume dos reagentes foram os seguintes: 1 µL de tampão de reação 10X, 0.3 µL de MgCl₂, 0.08 µL de DNTP, 0.06 µL de *Taq* polimerase, 1 µL de amostra de DNA. Para o conjunto III de *primers multiplex*, o volume dos reagentes foram as seguintes: 0,5 uL de tampão de reação 10X, 0.07 µL de MgCl₂, 0.08 µL de DNTP, 0.07 µL de *Taq* polimerase, 2 µL de amostra de DNA. Os volumes para cada *primer*

de cada conjunto *multiplex* foi seguido de acordo com o publicado por PIAGGIO *et al.* (2008), bem como os programas de desnaturação, anelamento e extensão através do termociclador.

4.3.3 SEQÜENCIAMENTO DAS REGIÕES REPETITIVAS (MICROSSATÉLITES)

As amostras sofreram denaturação a uma temperatura de 96°C durante dois minutos, seguido de resfriamento a -4°C durante dois minutos. Isto para separar as fitas de DNA definitivamente. Devido ao grande trabalho requerido, demora e dificuldade da interpretação dos dados que a aplicação da genotipagem através de eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR optou-se pela genotipagem em seqüenciador automático. Num primeiro momento, foi utilizado o seqüenciador automático modelo ABI 3130 (APPLIED BIOSYSTEMS®, Carlsbad, EUA) e, num segundo, o MegaBACE 1000 (AMERSHAN BIOSCIENCES®, Piscataway, EUA).

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

4.4.1 ALINHAMENTO

Obteve-se as seqüências dos *primers* de microssatélites disponibilizados no sítio eletrônico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), acessos EF591569–EF591580 do *GenBank*. Posteriormente, estes fragmentos de DNA foram alinhados no programa BIOEDIT – Biological Sequence Alignment Editor v. 7.0.5 (HALL, 2009) para que fosse possível saber a seqüência em que os *primers* de cada *locus* se encontravam. Isto porque os *primers* marcados com a mesma cor poderiam possuir alelos muito próximos, podendo haver uma leitura equivocada.

Além disso, através do alinhamento pode-se diagnosticar e distinguir o número de repetições em tandem, ou seja, tratando-se de um di ou trinucleotídeo.

4.4.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE ALÉLICA

A diversidade genética encontrada nos oito *loci* analisados para *D. rotundus* foi estimada pelo número de *loci* polimórficos, número de alelos por *locus*, heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) a partir das freqüências alélicas supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos *loci*. Gerados pela genotipagem e analisados no programa GENEMARKER v.1.6 (Soft Genetics LLC), o tamanho dos alelos é determinado pelos picos de intensidade, sendo os indivíduos heterozigotos para os *loci* estudados caracterizados pela presença de dois picos bem definidos, enquanto os homozigotos apresentam um pico apenas (**Figura 4**). Também são gerados dados a cerca da diversidade de *locus*. No programa CERVUS 3.0 (MARSHALL *et al.*, 1998) foram calculadas as freqüências alélicas observadas assumindo a Correção de Bonferroni e de Yates, bem como a estimativa de heterozigosidade esperada, a partir de seguindo do proposto por Nei (1978). Já o número de heterozigotos observados por *locus* foi obtido por contagem direta dos *locus* analisados.

Piaggio *et al.* (2008) ao analisar e descrever 12 *loci* de microssatélites para *Desmodus rotundus* não encontraram nenhuma evidência de desequilíbrio de ligação entre os *loci*. A aderência ao teorema de equilíbrio de Hardy-Weinberg e o coeficiente de endogamia também foram testados. Além disso, o número de alelos variou de dois a 13 por *locus*, sendo que os *loci* “Dero_G10F” e “Dero_B03R” demonstraram desvios significativos de equilíbrio de Hardy-Weinberg após as correções de Bonferroni (RICE, 1989). Apenas esses mesmos dois *loci* também demonstraram evidência de alelos nulos com um índice de consistência de 95%.

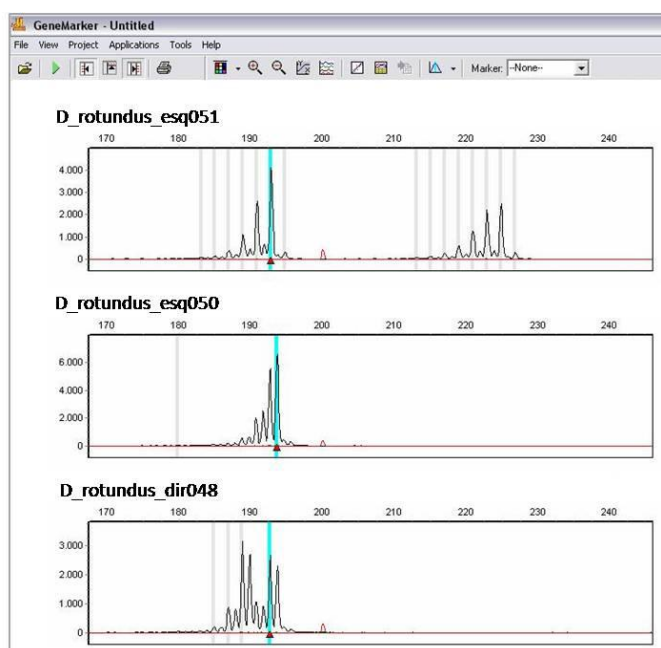


FIGURA 4: ELETROFEROGRAMA PRODUZIDO PELO SEQUENCIADOR MODELO ABI 3130 NO PROGRAMA GENEMARKER ILUSTRANDO A DIVERSIDADE GENÉTICA EM UM LOCUS DE MICROSSATÉLITES ENTRE ESPÉCIMES DE *D. ROTUNDUS*. Indivíduo esq051 (fêmea) apresentando dois picos de intensidade, sendo, portanto, um heterozigoto. Indivíduo esq050 (fêmea) apresentando um pico, sendo um homozigoto. Indivíduo dir048 (macho) apresentando dois picos subsequentes, sendo um heterozigoto.

4.4.3 ANÁLISE DE PARENTESCO

Uma vez que os microssatélites são os mais eficientes marcadores genéticos qualitativos para a avaliação molecular de parentesco (AVISE, 1994), os dados de diversidade alélica foram submetidos ao programa COLONY 2.0.0.1 (WANG, 2008) para essas análises. Neste, assume-se que há três subamostras: a prole, os candidatos a pais e as candidatas a mães. Supõe-se que os indivíduos jovens podem ser atribuídos como irmãos de pai e mãe, meio-irmãos ou não-irmãos; enquanto que os candidatos a pais e mães são considerados independentemente, mesmo que não haja informações sobre o genótipo dos parentais. O método de análise adotado foi o de verossimilhança total (*full-likelihood*), uma vez que é considerado mais acurado (WANG 2004; WANG & SANTURE 2009). As premissas adotadas foram que os sistemas de acasalamentos são a poliginia e a monoandria e quaisquer graus de parentesco não são previamente conhecidos. A probabilidade de paternidade nos machos candidatos estipulada foi de 0.5, e a de maternidade nas fêmeas candidatas de 0.2.

4.4.4 DISTRIBUIÇÃO DO SUCESSO REPRODUTIVO EM MACHOS

Em virtude da poliginia, a distribuição observada entre a paternidade dos machos foi comparada com a distribuição esperada em uma hipótese nula de distribuição aleatória. Tratando paternidade como um evento aleatório, o número de paternidades atribuídas a um macho sob a hipótese nula é uma variável aleatória de Poisson com parâmetro l , onde l é o número médio de paternidades para cada macho. Desvio a partir de cruzamentos aleatórios foi avaliado pelo padrão variância no sucesso reprodutivo (I), que é a variância no sucesso reprodutivo dividido pela média (BONESS *et al.*, 1993), e é equivalente ao índice de dispersão (KREBS, 1999).

4.4.5 ANÁLISE DO TAMANHO EFETIVO DA POPULAÇÃO

O tamanho efetivo da população (N_e) foi estimado a partir do programa COLONY 2.0.1.0 (WANG, 2009), o qual assume o método de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*). Na prática, quanto maior a proporção de irmãos e meio-irmãos dentro de uma população, menor será N_e , uma vez que se aumenta a frequência alélica de homozigotos.

5 RESULTADOS

5.1 METODOLOGIA APLICADA EM CAMPO

Foram capturados 100 espécimes de *D. rotundus* (incluindo 33 recapturas), sendo 25 fêmeas e 75 machos, inclusive nos meses de baixas temperaturas. Indivíduos jovens foram encontrados durante todo o ano, bem como aqueles ativos sexualmente, não havendo estação reprodutiva bem definida (**Tabela 1**). Também foram evidenciados movimentos locais entre as cavernas amostradas, sendo que houve quatro ocorrências de um espécime ter sido capturado na entrada de uma caverna e, na mesma noite, encontrado na entrada de outra caverna.

TABELA 1: NÚMERO DE INDIVÍDUOS, CONDIÇÃO ONTOGENÉTICA E REPRODUTIVA DE *D. ROTUNDUS* CAPTURADAS NO PERÍODO ENTRE JUNHO DE 2009 A MARÇO DE 2010, NO PARQUE ESTADUAL DE CAMPINHOS. Para os machos, inativos eram os espécimes cujos testículos se encontravam na cavidade abdominal; e ativos aqueles cujos testículos estavam visivelmente na bolsa escrotal. Fêmeas inativas eram aquelas não estavam grávidas ou lactantes; e ativas aquelas com mamas aleitadas, com mamas túrgidas e sem pêlos ao redor (pós-lactantes) ou com feto diagnosticado por apalpação (grávidas).

sexo	c. ontog	c. reprod	Jun/09	Jul/09	Ago/09	Out/09	Nov/09	Dez/09	Jan/10	Fev/10	Mar/10	TOTAL
macho	jovem	inativa	0	2	2	5	7	5	1	3	4	29
		ativo	0	0	0	0	2	1	0	2	2	7
	adulto	inativo	9	5	2	0	3	0	2	3	2	26
		ativo	2	1	0	0	4	0	2	3	1	13
fêmea	jovem	inativa	4	0	2	0	1	0	1	1	3	12
		ativa	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	adulto	inativa	4	2	1	1	0	0	1	0	2	11
		ativa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
			19	10	7	6	18	6	7	12	15	

5.2 METODOLOGIA APLICADA EM LABORATÓRIO

Dos 100 registros de captura e recaptura, foram encontrados 67 indivíduos diferentes. Dentre estes foram genotipados 49 indivíduos diferentes de *D. rotundus*, sendo 36 machos (20 jovens e 16 adultos) e 13 fêmeas (5 jovens e 8 adultas). Destes, foi possível a genotipagem de pelo menos um *locus*, nos quais foram encontrados 35 alelos diferentes de microssatélites a partir de amostras biológicas de sangue e tecido. As amostras de tecido da asa referente aos espécimes coletados nos nove meses amostrados tiveram seu DNA com média de concentração (ng/μL) de 13,07 e pureza de 2,09, sendo portanto apropriados para análises posteriores. Já as amostras de sangue não permitiram tais dados, uma vez que o kit de

extração utilizado mantém o DNA extraído no próprio papel filtro no qual o sangue fora previamente coletado. Tanto a coleta quanto o armazenamento das amostras biológicas se mostraram eficazes. Isto devido ao fato de que não houve diferenças entre média de concentração e/ou pureza ao longo dos meses em que as amostras foram coletadas e analisadas.

Quanto ao seqüenciamento, todas as amostras (sangue e tecido) que apresentaram sucesso na genotipagem foram derivadas do seqüenciador modelo ABI 3130, uma vez que nenhuma das 102 amostras genotipadas no seqüenciador automático do modelo MegaBACE 1000 apresentaram evidência de picos de intensidade.

5.3 ANÁLISE DOS DADOS

No programa CERVUS, a heterogozidade observada para cada um dos oito *loci* apresentou frequência alélica igual a 0.250, 0.609, 0.133, 0.370, 0.875, 0.417, 0.421 e 0.091. Logo, os oito *loci* analisados revelaram-se polimórficos para a espécie, sendo que foi encontrado um total de 35 alelos, sendo Dero_D02F o *locus* mais polimórfico (6 alelos diferentes) e o Dero_B11F o menos polimórfico (2 alelos). Este último também foi o *locus* mais encontrado na população, estando presentes em 45 indivíduos. Já o *locus* Dero_D02F_D02R foi menos encontrado, estando presente em apenas 11 indivíduos. Apenas este *locus* apresentou desvios significativos entre a proporção de heterozigosidades observada ($H_o = 0.091$) e esperada ($H_e = 0.680$) (**Tabela 2**)

Houve diferenças nas frequências alélicas entre os sexos, tanto para alelos em homozigose quanto para em heterozigose (**Tabela 3**). A maioria dos *loci* predominantemente em homozigose foi encontrada em fêmeas. Além disso, apenas em Dero_B03F_B03R (82,0% dos machos) e Dero_D06F_D06R (13,0% dos machos) a frequência alélica observada de homozigotos foi menor do que a de heterozigotos.

Já para jovens e adultos de forma geral, considerando machos e fêmeas concomitantemente, o número de homozigotos entre jovens e adultos se demonstrou semelhante (**Tabela 4**). No entanto, dentre os jovens foi observada frequência alélica de homozigotos menor do que a de heterozigotos apenas em Dero_B03F_B03R (71,0%), Dero_B11F_B11R (73,9%) e Dero_A08F_B01R (33,3%). Em números absolutos, todos os 24 adultos (machos e fêmeas) de *D. rotundus* apresentaram homozigose em Dero_B11F_B11R.

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA *DESMODUS ROTUNDUS* (N = 49). Número de alelos por *locus* (k), número de indivíduos no qual o alelo foi observado (N), tamanho dos fragmentos de DNA gerados por PCR (pb = pares de base), heterozigidade observada (Ho) e heterozigidade esperada (He), supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg. *Dados retirados de Piaggio *et al.* (2008)

<i>locus</i>	k	N	unidades repetitivas*	fragmento (pb)*	He	Ho
Dero_B03F_B03R	4	36	(AC) ₁₁	1111	0.439	0.250
Dero_B10F_E01R	5	23	(GA) ₂₀	660	0.649	0.609
Dero_B11F_B11R	2	45	(AC) ₈	291	0.164	0.133
Dero_C12F_B02R	4	27	(CA) ₁₇	625	0.495	0.370
Dero_D06F_D06R	5	32	(TC) ₆	545	0.620	0.875
Dero_A08F_B01R	5	12	(TC) ₂₇ (CA) ₂₃	486	0.732	0.417
Dero_C11F_C11R	6	19	(AG) ₉	1101	0.521	0.421
Dero_D02F_D02R	4	11	(GT) ₇ (GA) ₁₃ (AG) ₈	533	0.680	0.091

TABELA 3: CARACTERÍSTICAS DOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA *DESMODUS ROTUNDUS* (N = 49) EM CADA UM DOS SEXOS. Número de indivíduos no qual o alelo foi observado (N) e número de heterozigotos e homozigotos (frequência relativa de homozigotos por *locus*) encontrados na população.

<i>locus</i>	fêmeas			machos		
	N	heterozigotos	homozigotos	N	heterozigotos	homozigotos
Dero_B03F_B03R	13	5	8 (61,5%)	23	4	19 (82,0%)
Dero_B10F_E01R	10	5	5 (50,0%)	13	9	4 (30,8%)
Dero_B11F_B11R	13	0	13 (100%)	33	7	26 (78,8%)
Dero_C12F_B02R	7	1	6 (85,7%)	20	9	11 (55,0%)
Dero_D06F_D06R	9	8	1 (11,1%)	23	20	3 (13,0%)
Dero_A08F_B01R	6	2	4 (66,7%)	6	3	3 (50,0%)
Dero_C11F_C11R	9	3	6 (66,7%)	10	5	5 (50,0%)
Dero_D02F_D02R	3	0	3 (100%)	8	1	7 (87,5%)

TABELA 4: CARACTERÍSTICAS DOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA *DESMODUS ROTUNDUS* (N = 49) NAS DIFERENTES CONDIÇÕES ONTOGENÉTICAS. Número de indivíduos no qual o alelo foi observado (N) e número de heterozigotos e homozigotos (frequência relativa de homozigotos por *locus*) encontrados na população.

<i>locus</i>	jovens			adultos		
	N	heterozigotos	homozigotos	N	heterozigotos	homozigotos
Dero_B03F_B03R	14	4	10 (71,0%)	23	5	18 (78,3%)
Dero_B10F_E01R	6	2	4 (66,7%)	17	12	5 (29,4%)
Dero_B11F_B11R	23	6	17 (73,9%)	24	0	24 (100%)
Dero_C12F_B02R	13	8	5 (38,5%)	15	3	12 (80,0%)
Dero_D06F_D06R	16	14	2 (12,5%)	17	15	2 (11,8%)
Dero_A08F_B01R	3	2	1 (33,3%)	9	3	6 (66,7%)
Dero_C11F_C11R	4	0	4 (100%)	15	8	7 (46,7%)
Dero_D02F_D02R	3	0	3 (100%)	8	1	7 (87,5%)

As distribuições das frequências relativas de alelos por *locus* se demonstraram discrepantes para a maioria dos *loci* (**Figura 5**). Em Dero_B11F_B11R o alelo 196.0 apresentou frequência relativa por *locus* de 0.911, estando presente em 84 ocasiões sendo que dos 46 indivíduos nos quais estava presente, 39 estavam em homozigose e 6 em heterozigose. Os alelos Dero_B03F_B03R, Dero_C12F_B02R e Dero_D02F_D02R foram os que apresentaram um significativo maior número de indivíduos em homozigose (em relação aos heterozigotos), sendo 27, 17 e 10, respectivamente.

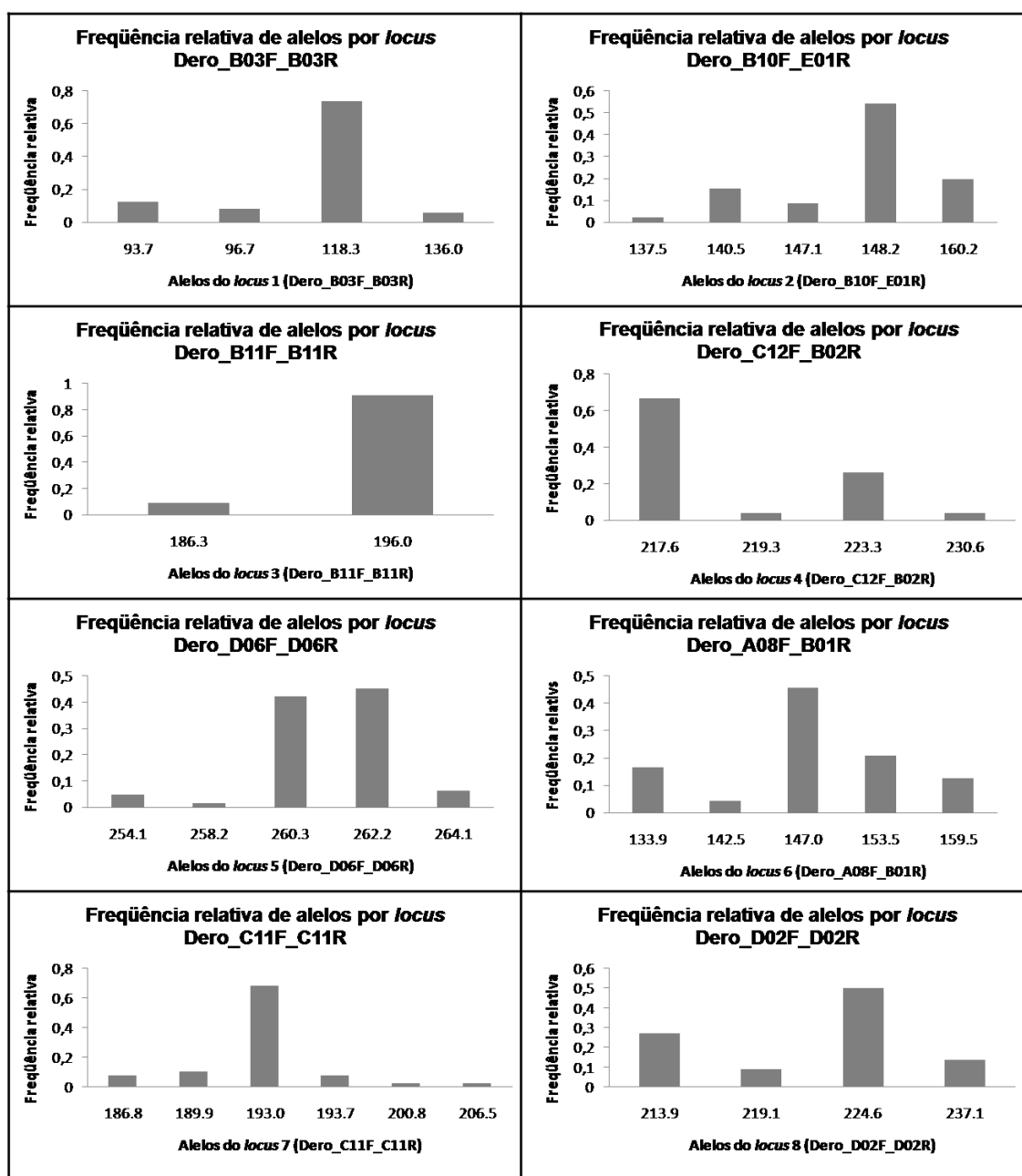


FIGURA 5: HISTOGRAMA ILUSTRANDO A DIVERSIDADE GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉICAS ENCONTRADAS PARA CADA UM DOS OITO *LOCI* DE MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA *DESMODUS ROTUNDUS*.

Quanto à análise de parentesco no programa COLONY, dois irmãos de pai e mãe foram encontrados em duas ocasiões ($p \approx 1$) e em outras duas ocasiões ($1 < p < 0.80$). Quatro irmãos de pai e mãe: em apenas uma ocasião, com $p \approx 1$. E cinco irmãos de pai e mãe: em apenas uma ocasião, com $p \approx 1$. Quatro descendentes tiveram pai e mãe encontrados, isto é, genotipados, e mais outros quatro foram inferidos como filhos de mesma mãe.

Também foram encontrados seis agrupamentos possíveis a partir do *software* COLONY. A **Tabela 5** apresenta os agrupamentos encontrados, sendo listados em ordem decrescente da probabilidade encontrada. O primeiro agrupamento apresenta seis indivíduos: pai (ID: dir069), mãe (ID: esq039) e quatro descendentes ($p \approx 1$). O segundo apresentou seis indivíduos: pai (dir065), mãe e quatro descendentes ($p \approx 1$). O terceiro, sete indivíduos: pai, mãe e cinco descendentes ($p \approx 1$). O quarto, quatro indivíduos: pai, mãe e dois descendentes ($p = 0.623$). O quinto, quatro indivíduos: pai, mãe e dois descendentes ($p = 0.340$). E o último com cinco indivíduos: pai, mãe e três descendentes ($p = 0.270$).

TABELA 5: ATRIBUIÇÃO DE GRAUS DE PARENTESCO AOS AGRUPAMENTOS FAMILIARES DE *DESMODUS ROTUNDUS* GERADOS A PARTIR DO PROGRAMA COLONY. Considerando que paternidade e maternidade são candidatos a pais e mães dados os filhotes irmãos encontrados, sendo p a probabilidade. Apesar de inferida a maternidade, a mãe não fora capturada e genotipada por este estudo (#). O mesmo foi utilizado para a paternidade (*). A atribuição individual (ID) foi realizada na sequência em que os indivíduos eram capturados em campo, sendo que machos (dir = anilha no antebraço direito) e fêmeas (esq = anilha no antebraço esquerdo) tinham numeração independente entre si.

Agrupamento	p	ID da prole	ID do pai	ID da mãe
1	≈ 1	dir058	dir069	esq039
		dir089		
		esq047		
		esq051		
2	≈ 1	dir079	dir065	#4
		dir085		
		esq045		
		esq050		
3	≈ 1	dir078	*3	#3
		dir087		
		dir096		
		dir098		
4	0.623	dir097	*4	#5
		dir100		
5	0.340	dir072	*1	#1
		dir075		
6	0.2707	dir074	*2	#2
		dir101		
		esq053		

Quanto ao sucesso reprodutivo, 16 indivíduos machos adultos genotipados foram analisados como candidatos à paternidade. No entanto, apenas dois machos (4 filhotes cada) foram apontados como pais a partir do programa COLONY. Mas apesar da inferência do sucesso reprodutivo ter demonstrado que dos 16 machos adultos genotipados, apenas dois indivíduos foram inferidos como pais dos 25 jovens (20 machos e 5 fêmeas), estatisticamente o padrão variância no sucesso reprodutivo (I) não pode ser avaliado.

6 DISCUSSÃO

6.1 METODOLOGIA APLICADA EM CAMPO

O pequeno número de fêmeas (26,5% do total) e ausência de filhotes capturados podem ter sido causados pelo fato de que as fêmeas e filhotes costumam manter-se nos abrigos, em agrupamentos chamados de “creches”. No entanto, espécimes de sexo, condição ontogenética e reprodutiva foram encontrados ao longo de todo o ano, não havendo estação reprodutiva bem definida. Os movimentos locais encontrados dos morcegos-vampiros entre as cavernas e corredores de voo são importantes para o aumento da diversidade genética da espécie, diminuindo os problemas acarretados pela organização social em harém.

A respeito das amostras biológicas, a metodologia de coleta e armazenagem foram eficientes inclusive para as amostras mais antigas, com quase 10 meses entre o período da coleta e da genotipagem dos microssatélites. O local em que o pedaço de tecido da asa era retirado não possui irrigação sanguínea (NEUWEILER, 2000) e aparentemente sem terminações nervosas, uma vez que os morcegos não expressavam nenhum sinal de dor ou desconforto. Além disso, estas pequenas mutilações efêmeras provavelmente não prejudicam o desempenho durante o voo (BOGDANOWICZ & URBÁNCZYK, 1986; ROCHA, 2005), não obstante, são regeneradas após poucas semanas. A coleta de sangue no papel-filtro demonstrou ser de fácil e prático manuseio. Ainda, a agulha de insulina permite que seja retirado apenas um pequeno volume de sangue do espécime, sem punção venosa e sem a manipulação excessiva. Logicamente que é necessário um pouco de prática para a habilidade de picar o local exato da veia do propatágio. Contudo ambas as metodologias foram eficazes e de baixo custo para a obtenção de amostras de tecido e sangue mantendo o bem-estar animal.

6.2 METODOLOGIA APLICADA EM LABORATÓRIO

As extrações de DNA de tecido da asa com o kit DNeasy obtiveram inicialmente concentrações relativamente baixa. No entanto, quando passou a se retirar um pedaço ligeiramente maior do tecido da asa, estas aumentaram em cerca de 20% na concentração de DNA.

A amplificação através de PCR *multiplex* nas amostras não-invasivas demonstrou vantajosa. Isto porque acarretou em redução dos custos de reagentes, aumento da velocidade durante a preparação e redução do consumo do extrato de DNA (BUTLER, 2005). Entretanto,

um problema comum com a genotipagem de microssatélites é o aparecimento de falsos negativos, quando um alelo não amplifica, levando a heterozigotos aparecendo como homozigotos para tal alelo. Para tanto, foram repetidas as amostras que apresentavam picos de tamanho reduzido.

Já a genotipagem dos microssatélites foi eficiente apenas no seqüenciador modelo ABI 3130. Mesmo aquelas amostras que há em duplicata que já haviam tido resultado no modelo ABI 3130, não foram encontrados nenhuma evidência de *locus* no modelo MegaBACE 1000.

6.3 ANÁLISE DOS DADOS

Quanto à diversidade genética, notou-se significativa frequência alélica de homozigotos encontrada em alguns dos *loci* de microssatélites analisados, podendo acarretar vários danos à espécie, isto porque a homozigose diminui a diversidade alélica. Uma vez que é a estruturação genética de cruzamentos locais que são relevantes para a dinâmica da mudança microevolutiva da espécie.

A estrutura genética de populações é amplamente determinada pelo comportamento reprodutivo dos indivíduos dentro delas. Em particular, uma grande variação no sucesso reprodutivo masculino associado à poligamia pode diminuir o tamanho da população e efetivo, podendo acelerar a deriva genética e seleção (CHESSEY 1991). Em espécies com formação de harém, como *D. rotundus*, a capacidade do indivíduo do sexo masculino monopolizar o acesso aos grupos de fêmeas adultas resulta em elevados níveis de parentesco dentro de cada colônia. Mas a endogamia pode ser minimizada em populações de mamíferos social, como resultado direto de comportamentos que promovam a prevenção ativa de acasalamentos incestuosos ou como um resultado indireto de sexo com viés de dispersão (SMITH 1993; PUSEY & WOLF, 1996).

A presença de alelos homozigotos em adultos (machos e fêmeas) foi ligeiramente maior do que em jovens (machos e fêmeas), sugerindo que a taxa de endogamia não sofreu fortes discrepâncias ao longo do tempo entre estas gerações. Já a presença de homozigotos maior em fêmeas do que em machos, demonstra assimetria alélica na população, corroborando com a idéia de filopatria de fêmeas. Filopatria de fêmeas e machos solitários também foi visto em haréns do morcego *Rhinolophus ferrumequinum* (ROSSITER *et al.*, 2000).

Em um estudo comportamental do morcego *Saccopteryx bilineata* (HECKEL & von HELVERSEN, 2003) observou-se que alguns machos jovens periféricos ao harém e se

reproduziam eventualmente. Isto permitiu que o sucesso reprodutivo em machos dominantes fosse quase o dobro do que o dos machos periféricos. O que demonstra que apesar do esforço dos machos periféricos ao acesso às fêmeas ser maior do que em dominantes, as táticas comportamentais não são igualmente rentáveis.

A discrepância entre o tamanho efetivo da população (N_e) e o censo (N) encontrado neste estudo, além do aporte da diminuição da variabilidade genética, pode ser devido a inúmeros fatores. Dentre estes, a subdivisão da população analisada em um número de grupos reprodutores, recentes reduções no tamanho da população e/ou tamanho da população do entorno excedendo a área amostrada por este estudo. Contudo, o baixo N_e encontrado não necessariamente seja consequência da endogamia, mas talvez um reflexo do aumento recente da abundância da espécie que seria rara localmente no passado evolutivo recente.

Assim como visto em lobos-marinhos (*Arctocephalus australis*) do Peru, o sistema reprodutivo poligínico com a formação de haréns acarreta num tamanho efetivo populacional sempre muito menor que o tamanho populacional estimado (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Isto porque nesse sistema um número reduzido de machos (dominantes) é capaz de copular com várias fêmeas.

No entanto, para Wilkinson (1985) embora as fêmeas juvenis provavelmente sejam recrutadas pelos machos dominantes, o intercâmbio ocasional de fêmeas reprodutoras entre grupos vizinhos e a baixa taxa de sobrevivência dos juvenis não permitem que os níveis significativos de parentesco entre os indivíduos da colônia sejam preocupantes. Além disso, a média máxima de paternidade para o macho dominante é de apenas 46%. Por conseguinte, o sucesso de acasalamento dos machos é suficientemente aleatório para manter o equilíbrio gamético entre todos os pares de *loci* analisados. Os machos adultos que apresentaram inferência de paternidade foram dir069 e dir065. O indivíduo dir069 foi encontrado em uma única ocasião, sendo em Jun/09 às 00h20 na Gruta da Fada. Já o dir065 foi encontrado em duas ocasiões, cada uma em uma extremidade da Gruta dos Jesuítas, sendo em Jun/09 e Nov/09. Ambos os machos estavam inativos e apresentavam duas das maiores medidas de antebraço direito encontradas na área amostral, sendo 59,8 e 60,6 mm de comprimento, respectivamente. A baixa taxa de recaptura destes machos adultos, associado ao tamanho grande do antebraço, sugere que possam ser machos dominantes, uma vez que a territorialidade não permite que se tenha alta atividade de forrageio e que machos grandes e fortes podem defender seu agrupamento de invasores periféricos e predadores melhor do que machos menores.

Os seis agrupamentos inferidos de acordo com a similaridade alélica dos indivíduos capturados sugerem que há alto grau de parentesco entre 23 dos 49 indivíduos genotipados neste estudo. Ou seja, as colônias de *D. rotundus* genotipadas apresentaram, em média, 4.67 indivíduos. Número abaixo do comumente encontrado em ambientes cavernícolas no Brasil: colônias de cerca dez de quinze indivíduos.

Como há pouca diversidade genética entre os indivíduos de uma mesma população, para a genética de populações, há apenas nove indivíduos distintos da população de *D. rotundus* que contribuem para o aporte de diversidade alélica na prole das próximas gerações. O tamanho populacional (censo, N) ser usualmente o único parâmetro utilizado para avaliar o grau de ameaça das espécies. Entretanto, do ponto de vista genético, o tamanho efetivo da população (N_e) é mais importante do que o tamanho populacional obtido através de censos (N), sendo influenciado, por exemplo, pelos desvios na proporção sexual dos indivíduos reprodutivos. Esse valor pode ser considerado um valor crítico tendo em vista que é bem menor que o número mínimo de indivíduos em idade reprodutiva que se acredita ser necessário para manter a viabilidade populacional de espécies de vertebrados. Além disso, quanto menor o tamanho efetivo da população, mais rapidamente a heterozigosidade será perdida.

Vale lembrar que um número maior que seis *loci* polimórficos e um número de indivíduos maior do que 90 é necessário para se obter estimativas razoavelmente precisas de N_e (WAPLES, 1991; BARTLEY *et al.*, 1992). Recentes avanços de amostragem genética não-invasiva podem aumentar a capacidade de obtenção de amostras de organismos ameaçados ou secreto. Obviamente que um número maior que 90 ainda pode ser problemático para espécies ameaçadas de extinção com tamanhos de populações extremamente pequenas e para espécies dispersas por grandes áreas geográficas ou terreno acidentado que requer amplos esforços de amostragem. Apesar dessas dificuldades não ocorrerem no caso de *Desmodus rotundus*, o número de indivíduos genotipados neste estudo foi de 49. Ainda, embora as tecnologias de Genética da Conservação e modelos de estimativa de N_e e N estão sendo desenvolvidos, a aplicação combinada destes para monitoramento populacional ainda é incipiente.

7 CONCLUSÃO

Mesmo considerado uma espécie comum e abundante, *Desmodus rotundus* possui restrições de distribuição e ocupação de nichos, como a perda de habitat (ex.: cavernas) e de alimento. Logo, este estudo sugere que populações isoladas de *D. rotundus* poderão diminuir o nível de diversidade devido às características particulares do seu acasalamento e sistemas demográficos. Estes resultados têm importantes implicações para a manutenção em longo prazo dos recursos genéticos em regiões geograficamente isoladas, mesmo sendo considerada atualmente uma espécie comum e abundante.

O conhecimento de parentesco é importante no contexto comportamental e ecológico. O acasalamento é difícil de observar na maioria das espécies selvagens, mas o comportamento reprodutivo, variabilidade genética e o tamanho efetivo da população podem ser deduzidos através de informações moleculares de maternidade e paternidade. Que por sua vez, pode contribuir para o conhecimento da ecologia e evolução do sistema reprodutivo da espécie.

A estimativa de N_e , associada aos efeitos e da frequência de eventos de controle populacional indiscriminados, são de preocupação para a sobrevivência de populações de *Desmodus rotundus*. Portanto, devem ser levados em consideração em futuras tentativas de conservação e proteção ao longo de toda a distribuição da espécie, antes mesmo que estas populações estejam ameaçadas.

Este estudo foi o primeiro a utilizar marcadores moleculares de alta resolução (microssatélites) para examinar os padrões de parentesco e tamanho efetivo da população de machos em *Desmodus rotundus*, provendo dados mais detalhado sobre o comportamento da reprodução da espécie. Diante da acuidade da diversidade genética para as espécies e/ou populações animais e as possíveis conseqüências de alterações em seus padrões naturais, estudos genéticos nesse âmbito envolvendo a caracterização dos níveis de variabilidade genética e dentro das populações e espécies são de suma importância.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; MALÁGA-ALBA, M. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: **Natural history of vampire bats**. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 207-214, 1988.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 4ª ed. traduzida, 1464 f., 2004.
- ALTMANN, J. Age cohorts as paternal sibships. **Behavioral Ecology Sociobiology**. v. 6, p. 161-164, 1979,
- AMOS, W.; BALMFORD, A. When does conservation genetics matter? **Heredity**. v. 87, p. 257-265, 2001.
- ANTHONY, E. L. P. Age determination in bats. In: **Ecological and behavioral for study of bats**. KUNZ, T. H. (Ed.). Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 533 f., 1988.
- ARITA, H. Rarity in Neotropical bats: correlations with phylogeny, diet, and body mass. **Ecological Applications**. v. 3, n. 3, p. 506-517, 1993.
- ARNONE, I. S.; PASSOS, F. C. Estrutura de comunidade da quiropteroфаuna (Mammalia, Chiroptera) do Parque Estadual de Campinhos, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira Zoologia**. Curitiba, v. 24, n. 3, p. 573-581, 2007.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. New York: London, Chapman & Hall, 511 f., 1994.
- BAER, G. M. **The natural History of Rabies**. Florida: CRC Press, 2 ed., 620 f., 1991.
- BARTLEY, D.; BAGLEY, M.; GALL, G.; BENTLEY, B. Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. **Conservation Biology**. v. 6, p. 365–375, 2002.

BAULLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**. v. 11, p. 155-165, 2002.

BEJA-PEREIRA, A.; OLIVEIRA, R.; ALVES, P. C.; SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 1-23, 2009.

BERNARD, E. Morcegos vampiros: sangue, raiva e preconceito. **Ciência Hoje**. Rio de Janeiro, v. 36, n. 214, p. 44-49, 2005.

BENNETT, L. B.; SHRIVER, M. D.; BOWCOCK, A. M. Markers and methods for reconstructing modern human history DNA sequence. **The Journal of Sequencing and Mapping**. v. 8, p. 329-341, 1998.

BRASS, D. A. **Rabies in bats: Natural History and Public Health Implications**. Connecticut: Livia Press, 342 f., 1994.

BREDT, A. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de Manejo e Controle**. Brasília, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 117 f., 1998.

BREDT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira Zoologia**. v. 16, n. 3, p. 731-770, 1999.

BONESS, D. J.; BOWEN, W. D.; FRANCIS, J. M. Implications of DNA fingerprinting for mating systems and reproductive strategies of pinnipeds. **Symposia of the Zoological Society of London**. v. 66, p. 61-93, 1993

BOBROWIEC, P. E. D. **Caracterização molecular da dieta do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Mammalia: Chiroptera) na Amazônia brasileira**. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2007.

BOGDANOWICZ, W.; URBAŃCZYK, Z. 1986. A case of selfhealing of a broken forearm in *Myotis brandtii* (Eversmann, 1845). **Acta Theriologica**. v. 31, p. 180-181, 1986.

BORÉM, A. ; SANTOS, F. R. **Biotecnologia Simplificada**. 1. ed. Editora Suprema, v. 1, 249 f., 2002.

BROQUET, T.; MÉNARD, N.; PETIT, E. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error. **Conservation Genetics**. v. 8, p. 249-260, 2007.

BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Current Opinion Genetics and Development**. v. 3, p. 939-943, 1993.

BUTLER, J. M. Constructing STR multiplex assays. **Methods in Molecular Biology**. v. 297, p. 53-66, 2005.

CALISHER, C. H.; CHILDS, J. E.; FIELD, H. E.; HOLMES, K. V.; SCHOUNTZ, T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 3, p. 531-545, 2006.

CARDOSO, M.; UIEDA, W.; BREDT, A. Influência do ciclo lunar na utilização de presas por *Desmodus rotundus*. In: **Cadernos de Resumos**, XXI Congresso Brasileiro de Zoologia. v. 21, p. 240, 1996.

CAUGHLEY, G.; GUNN, A. **Conservation biology in theory and practice**. Cambridge: Blackwell Science, 459 f., 1996.

CHARLESWORTH, D.; WILLIS, J. The genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews – Genetics**. v. 10, 2009.

CIOFI, C.; BRUFORD, M. W. Genetic structure and gene flow among komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. **Molecular Ecology**. v. 8, Suppl.: S17-S30, 1999.

CONSTABLE, J. L.; ASHLEY, M. V.; GOODALL, J.; PUSEY, A. E. Noninvasive paternity assignment in Gombe chimpanzees. **Molecular Ecology**. v. 10, p. 1279-1300, 2001.

CONSTANTINE, D. G. Bats in relation to the health, welfare, and economy of man. *In: **Biology of bats***. WIMSATT, W. A. (Ed.), New York: Academic Press, v. 2, p. 320-468, 1970.

____. Transmission of pathogenic microorganisms by vampire bats. *In: **Natural history of vampire bats***. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 167-189, 1988.

CONRAD, K. F.; JOHNSTON, P. V.; CROSSMAN, B. K.; ROBERTSON, R. J.; WHEELWRIGHT, N. T.; BOAG, P. T. High levels of extra-pair paternity in an isolated, low density, island population of three swallows (*Trachycineta bicolor*). **Molecular Ecology**. v. 10, p. 1301-1308, 2001.

CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for inferring recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**. v. 144, p. 2001-2014, 1996.

CREEL, S.; SPONG, G.; SANDS, J. L.; ROTELLA, J.; ZEIGLE, J.; JOE, L.; MURPHY, K. M.; SMITH, D. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 2003-2009, 2003.

CRESPO, J. A.; VANELLA, J. M.; BLOOD, B. J.; DE CARLO, J. M. Observaciones ecológicas del vampiro *Desmodus r. rotundus* (E. Geoffroy) en el norte de Córdoba. **Revista del Museo Argentino Ciencias Naturales 'Bernardino Rivadavia'**. Instituto Nacional del Investigación de Las Ciencias Naturales, v. 6, p. 131-160, 1961.

CRESPO, R. F.; LINHART, S. B.; BURNS, R. J.; MITCHELL, G. C. Foraging behavior of the common Vampire bat related to moonlight. **Journal of Mammalogy**. v. 53, n. 2, p. 366-368, 1972.

CRNOKRAK, P.; ROFF, D.A. Inbreeding depression in the wild. **Heredity**. v. 83, p. 260-270, 1999.

CROW, J. F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. Minneapolis: Burgess. 591 f., 1970.

DAVIS, L.M.; GLENN, T.C.; ELSEY, R. M.; DESSAUER, H. C.; SAWYER, R. H. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. **Molecular Ecology**. v. 10, p. 1011-1024, 2001.

DOBZHANSKY, T.; AYALA, F. J.; STEBBINS, G. L.; VALENTINE, J. W. **Evolution**. W.H. Freeman and Company, San Francisco, Califórnia, 572 f., 1977.

ESBÉRARD, C. E. L. Influência do ciclo lunar na captura de morcegos Phyllostomidae. **Iheringia, Série Zoologia**. v. 97, n. 1, p. 81-85, 2007.

ERLICH, H. A. **PCR technology**: principles and applications for DNA amplification. ERLICH, H. A. (Ed.). Oxford: Library of Congress Cataloging in Publication Data, 246 f., 1992.

ERNEST, H. B.; PENEDO, M. C. T.; MAY, B. P.; SYVANEN, M.; BOYCE, W. M. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. **Molecular Ecology**. v. 9, p. 433-441, 2000.

FLEMING, T. H.; HOOPER, E. T.; WILSON, DON E. Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles, and movement patterns. **Ecology**. v. 53, n. 4, p. 555-569, 1972.

FORBES, S. H.; ALLENDORF, F. W. Associations between mitochondrial and nuclear genotypes in cutthroat trout hybrid swarms. **Evolution**. v. 45, p. 1332-1349, 1991.

FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetic Research**. v. 66, p. 95-106, 1995.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D; BRISCOE, D. A. **Introduction of Genetics of Conservation**. Cambridge, Cambridge University Press, 644 f., 2002.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D; BRISCOE, D. A. **A Primer of Conservation Genetics**. 3^a ed. reimp. Cambridge: Cambridge University Press, 242 f., 2007.

FREITAS, M. B. D. 2000. **Metabolismo do morcego hematófago *Desmodus rotundus***. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2000.

GARNIER, J. N.; BRUFORD, M. W.; GOOSENS, B. Mating system and reproductive skew in the black rhinoceros. **Molecular Ecology**. v. 10, p. 2031-2041, 2001.

GARRAFFONI, A. R. S.; NEGRELLO-FILHO, O. A. Novas fronteiras da Biologia Evolutiva: a era dos dados moleculares. *In: Revisões em Zoologia I*, MONTEIRO-FILHO, E. L. e ARANHA, J. M. R. (Orgs). Curitiba: SEMA/PR, p. 35-46, 2006.

GITTI, C. B. Doenças transmitidas ou relacionadas aos morcegos. *In: Curso sobre controle da raiva silvestre (D. rotundus) no Brasil*. SOUZA, J. C. P.; GITTI, C. B. & NOGUEIRA FILHO, V. D. (Orgs). Rio de Janeiro, Convênio MAPA/PANAFTOSA-OPAS/OMS, p. 35-40, 2007.

GONZALEZ, R.; MITCHELL, G. C. Vampire bat control programs in Latin America. **Proceedings of the 7th Vertebrate Pest Conference** Vertebrate Pest Conference Proceedings collection, p. 254-257, 1976.

GRATIVOL, A. D.; BALLOU, J. D.; FLEISCHER, R. C. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Conservation Genetics**. v. 2, p.1-9, 2001.

GREENHALL, A. M. Notes on behavior of captive vampire bats. **Mammalia**. v. 29, n. 4, p. 441-51, 1965.

_____. Vampire bat control in the Americas: A review and proposed program for action. **Bulletin of the Pan American Health Organization**. v. 8, n. 1, p. 30-35, 1974.

_____. Feeding behavior. *In: Natural history of vampire bats*. GREENHALL, A. M. & SCHIMDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press, p. 111-131, 1988.

GREENHALL, A. M.; JOERMANN, G.; SCHMIDT, U. *Desmodus rotundus*, Vampire Bat. **Mammalian Species**. n. 202, p. 1-6, 1983.

GREENHALL, A.M.; PARADISO, J. L., **Bats and bat banding**. Bureau Sport Fisheries and Wildlife Resource Publication, n. 72, p. iv-47, 1968.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. F.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; SUZUKI, D. T.

Introdução à Genética. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 764f., 2006

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series.** v. 41, p. 95-98, 1999.

HILL, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetics Research.** v. 38, p. 209-216, 1981.

JANEČKA, J. E.; GRASSMAN JR, L. I.; HONEYCUTT, R. L.; TEWES, M. E. Whole Genome Amplification for Sequencing and Applications in Conservation Genetics. **Journal of Wildlife Management.** v. 71, n. 4, p. 1357–1360, 2007.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution.** v. 11, p. 424-429, 1996.

JOHNSON, W. E; PECON-SLATTERY, J.; EIZIRIK, E.; KIM, J. H.; MENOTTIRAYMOND, M.; BONACIC, C.; CAMBRE, R.; CRAWSHAW, P.; NUNES, A.; SEUÁNEZ, H. N.; MOREIRA, M. A. M.; SEYMOUR, K. L.; SIMON, F.; SWANSON, W.; O'BRIEN, S. J. Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. **Molecular Ecology.** v. 8, Suppl.:S79-S92, 1999.

KASHI, Y., KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics.** v. 13, n. 2, p. 74-77, 1997.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology and Evolution.** v.17, n.5, 230-241, 2002.

KOCHER, T. D.; WHITE, T. J. Evolutionary Analysis via PCR. *In: PCR technology: principles and applications for DNA amplification.* ERLICH, H. A. (Ed.). Oxford, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, p. 137-147, 1992.

KOHN, M. H.; WAYNE, R. K. Facts from feces revisited. **Tree.** v. 12, n. 6, p. 223-227, 1997.

KOTAIT, I. Raiva em morcegos no Brasil. **Anais do IV Encontro Brasileiro para o Estudo de Quirópteros (EBEQ)**, p. 28-29, 2002.

KREBS, C. J. **Ecological Methodology**. 2ª ed. Longman, United States: Mento Park, 620p. 1999.

KUNZ, T. H.; PIERSON, E. D. Bats of world: na introduction. *In*: **Walker's bats of the world**. NOWAK, R. M. (Ed.) Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, p. 1-46, 1994.

LACY, R.C. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. **Journal of Mammalogy**. v. 78, n. 2, p. 320-335, 1997.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**. v. 241, p. 1455-1460, 1988.

LAVAl, R. K. Banding returns and activity periods of some Costa Rican bats. **SouthWestern Naturalist**. v. 15, n. 1, p. 1-10, 1970.

LINHART, S. B.; CRESPO, R. F.; MITCHELL, G. C. Control del murciélagos vampiros por medio de un anticoagulante. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana**. v. 73, n. 2, p. 100-109, 1972.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**. v. 4, p.398-401, 1989.

LU, Z., JOHNSON, W. E., MENOTTI-RAYMOND, M., YUHKI, N.; MARTENSON, J. S.; MAINKA, S.; SHI-QIANG, H.; ZHIHE, Z.; LI, G.; PAN, W.; MAO, X.; O'BRIEN, S. J. Patterns of genetic diversity in remaining giant panda populations. **Conservation Biology**. v. 15, n. 6, p. 1596-1607, 2001.

MARINHO-FILHO, J. S.; SAZIMA, I. Activity patterns of six phyllostomid bat species in southeastern Brazil. **Revista Brasileira Biologia**. v. 49., n. 3, p. 777-782, 1989.

- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**. v. 7, p. 639-655, 1998.
- MARTINS, F. M.; DITCHFIELD, A. D.; MEYER, D.; MORGANTE, J. S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolution Research**. v. 45, n. 4, p. 372-378, 2007.
- MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: **Biologia Molecular e Evolução**. MATIOLI, S. R. (Ed.). 2. ed. reimp., Ribeirão Preto: Editora Holos, p. 153-161, 2004.
- MAYEN, F. Haematophagous Bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on Public Health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of Veterinary Medicine B**. v. 50, p. 469-472, 2003.
- MCCRACKEN, G. F.; BRADBURY, J. W. Paternity and genetic heterogeneity in the polygynous bat, *Phyllostomus hastatus*. **Science**. v. 198, p. 303-306, 1977.
- MCCRACKEN, G. F.; BRADBURY, J. W. Social organization and kinship in the polygynous bat *Phyllostomus hastatus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v.8, p. 11-34, 1981.
- McFARLAND, W. N.; WIMSATT, W. A. Renal function and its relation to the ecology of the Vampire Bat, *Desmodus rotundus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 28, p. 985-1006, 1969.
- MCKELVEY, K. S.; SCHWARTZ, M. K. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. **Journal of Wildlife Management**. v. 68, n. 3, p. 439-448, 2004.
- MCKELVEY, K. S.; KIENAST, J. VON; AUBRY, K. B.; KOEHLER, G. M.; MALETZKE, B. T.; SQUIRES, J. R.; LINDQUIST, E. L.; LOCH, S.; SCHWARTZ, M. K. DNA Analysis of hair and scat collected along snow tracks to document the presence of Canada lynx. **Wildlife Society Bulletin**. v. 34, n. 2, p. 451-455, 2006.

MCNAB, B. K. Energetics and the distribution of vampires. **Journal of Mammalogy**. v. 54, n. 1, p. 131-144, 1973.

MILLS, L. S.; CITTA, J. J.; LAIR, K. P.; SCHWARTZ, M.; TALLMON, D. A. Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: promise and pitfalls. **Ecological Applications**. v. 10, n. 1, p. 283-294, 2000.

MITCHELL, G. C.; CRESPO, R. F.; BURNS, R. J.; SAID, F. S. Vampire bats: rabies transmission and livestock production in Latin America. **Denver Wildlife Research Center**. Series of Annual Reports from 1969 through 1975, Denver: U. S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 30 f., 1972.

MITCHELL, G. C.; BURNS, R. J. **Chemical control of Vampire Bats**. Denver: U. S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 1973.

MORIN, P. A.; MOORE, J. J.; CHAKRABORTY, R.; JIN, L.; GOODALL, J.; WOODRUFF, D. S. Kin selection, social structure, gene flow and the evolution of chimpanzees. **Science**. v. 265, n. 1193-1201, 1994.

MORIN, P. A.; CHAMBERS, K. E.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). **Molecular Ecology**. v. 10, p. 1835-1844, 2001.

MORIN, P. A.; WOODRUFF, D. S. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. *In*: **Molecular genetic approaches in conservation**. SMITH, T. B. & WAYNE, R. K. (Eds). Oxford: Oxford University Press, p. 298-313, 1996.

MURRAY, B. W. 1996. **The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data**. <http://helix.mcmaster.ca/brent/brent.html>. Acesso em: 24/jun/2010.

NADER, W.; WERNER, D.; WINK, M. Genetic diversity of scarlet macaws *Ara macao* in reintroduction studies for threatened populations in Costa Rica. **Biological Conservation**. v. 87, p. 269-272, 1998.

NAVIDI, W.; ARNHEIM, N.; WATERMAN, M. S. A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. **American Journal Human Genetics**. v. 50, p. 347-359, 1992.

NEI, M.. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. v. 89, p. 583-590, 1978.

NESJE, M.; ROED, K. H.; LIFJELD, J. T.; LINDBERG, P.; STEENS, O. F. Genetic relationships in the falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**. v. 9, p. 53-60, 2000.

NEUWEILER, G. **The Biology of Bats**. Oxford: Oxford University Press, 314 f., 2000.

NUNNEY, L. The effective size of a hierarchically structured population. **Evolution**. v.53, p.1-10, 1999.

O' BRIEN, G. M. Seasonal reproduction in flying foxes, review in the context of other tropical mammals. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 5, p. 499-521, 1993.

OLIVEIRA, L. R.; ARIAS-SCHREIBER, M.; MEYER, D.; MORGANTE, J. S. Effective population size in a bottlenecked fur seal population. **Biological Conservation**. v. 131, p. 505-509. 2006.

PACKER, C.; PUSEY, A. E., ROWLEY, H.; GILBERT, D. A.; MARTENSON, J.; O'BRIEN, S. J. Case study of a population bottleneck: lions of the Ngorongoro Crater. **Conservation Biology**. v. 5, p. 219-230, 1991.

PALUMBI, S.R. PCR and molecular systematics. *In: Molecular Systematics*. HILLIS, D.; MORITZ, C. & MABLE, B. (Eds.) Sunderland, Sinauer Press. 2^a ed., p. 205-247, 1996.

PARANÁ. Instituto Ambiental do Paraná – IAP. **Plano de Manejo do Parque Estadual de Campinhos**. Curitiba: IAP. 2003.

PECHMANN, J. H. K.; SCOTT, D. E.; SEMLITSCH, R. D.; CALDWELL, J. P.; VITT, L. J.; GIBBONS, J. W. Declining amphibian populations: The problem of separating human impacts from natural fluctuations. **Science**. v. 253, p. 892-895, 1991.

PEDRO, W. A.; TADDEI, V. A. Taxonomic assemblage of bats from Panga Reserve, southeastern Brazil: abundance patterns and trophic relations in the Phyllostomidae (Chiroptera). **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. Sér.)**. v. 6, p. 3-21, 1997.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em Genética da Conservação. In: **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre**. CULLEN, L.; RUDRAN, R. & VALADARES-PADUA, C. (Orgs). Curitiba: Editora UFPR, p. 343-382, 2004.

PIAGGIO, A. G.; JOHNSTON, J. J.; PERKINS, S. L. Development of polymorphic microsatellite loci for the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Molecular Ecology Resources**. v. 8, p. 440-442, 2008.

RALLS, K.; BALLOU, J. D.; TEMPLETON, A. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. **Conservation Biology**. v. 2, n.2, 185-193, 1988.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**. v. 43, p. 223-225, 1989.

RIDDLE, A. E.; PILGRIM, K. L.; MILLS, L. S.; MCKELVEY, K. S.; RUGGIERO, L. F. Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. **Conservation Genetics**. v. 4, p. 241-243, 2003.

ROCHA, F. A. **Abrigos Diurnos, Agrupamentos e Lesões Corporais no Morcego Hematófago *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae) do Estado de São Paulo**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

ROSSITER, S. J.; JONES, G; RANSOME, R. D.; BARRATT, E. M. Parentage, reproductive success and breeding behaviour in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) **Proceedings of the Royal Society of London B.Biological Sciences**. v. 267, p. 545-551, 2000.

SAZIMA, I. Aspectos do comportamento alimentar do morcego hematófago, *Desmodus rotundus*. **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**. v. 3, p. 97-119, 1978.

SCHLÖTHERER, C. Microsatellites. *In: Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*. HOELZEL, A.R. (Ed.) 2^a ed. New York: Oxford University Press Inc., p. 237-261, 1998.

SCHONEWALD-COX, C. M. Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations. *In: Genetics and conservation*. SCHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B. & THOMAS, L. (Eds.), Califórnia: Benjamin/Cummings Publishing Company, p. 51-65, 1983.

SCHWARTZ, M. K.; TALLMON, D. A.; LUIKART, G. Review of DNA-based census and effective population size estimators. **Animal Conservation**. v. 1, p. 293-299, 1998.

SCHWARTZ, M. K.; PILGRIM, K. **Protocols for Collecting and Storing DNA Samples**. http://www.rmrs.nau.edu/wildlife/genetics/pdfs/SchwartzPilgrimDNA_tissue_storage_12_12_06.pdf. Acesso em: 30/nov/2008

SHRIMPTON, J. M.; HEATH, D. D. Census vs. effective population size in chinook salmon: large- and small-scale environmental perturbation effects. **Molecular Ecology**. v. 12, n. 10, p. 2571-2583, 2003.

SLATKIN, M. Gene flow and population structure. *In: Ecological Genetics*. REAL, L. A. (Ed). Princeton University Press. p. 3-17, 1994.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. *In: Biologia Molecular e Evolução*. MATIOLI, S. R. (Ed.). 2. ed. reimp., Ribeirão Preto: Editora Holos, p.172-192, 2004.

STORZ, J. F.; BHAT, H. R.; KUNZ, T. H. Social structure of a polygynous tent-making bat, *Cynopterus sphinx* (Megachiroptera). **Journal of Zoology**. v. 251, p. 151-165, 2000.

STORZ, J. F.; BHAT, H. R.; KUNZ, T. H. Genetic consequences of polygyny and social structure in an Indian fruit bat, *Cynopterus sphinx*. II. Variance in male mating success and effective population size. **Evolution**. v. 55, p. 1224-1232, 2001.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **TREE**. v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.

TABERLET, P.; CAMARRA, J.-J.; GRIFFIN, S.; UHRES, E.; HANOTTE, O.; WAITS, L. P.; DUBOIS-PAGANON, C.; BURKE, T.; BOUVERT, J. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. **Molecular Ecology**. v. 6, p. 869-876, 1997.

TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *In: DNA fingerprinting state of the science*. PENA, S. D. J.; CHAKRABORTY, R.; EPPLEN, T. J.; JEFFREYS, A. J. (Eds.). Boston: Birkhäuser, p. 21-28, 1993.

TRAJANO, E. **Padrões de distribuição e movimentos de morcegos cavernícolas no Vale do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo**. 187 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981.

UIEDA, W. **Aspectos do comportamento alimentar das três espécies de morcegos hematófagos (Chiroptera, Phyllostomidae)**. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1982.

_____. Morcegos hematófagos e a raiva dos herbívoros no Brasil. *In: Anais do Seminário de Ciências das Faculdades Integradas de Uberaba* (FIUBE). p.13-29, 1987.

UIEDA, W.; DEBERALDINI, E. R. Papel do morcego hematófago *Desmodus rotundus* na transmissão da raiva. Porto Alegre, **Anais do IV Encontro Brasileiro para o Estudo de Quirópteros (EBEQ)**. v. 4, p. 32-36, 2002.

VILLA-R., B. **Los murciélagos de Mexico**. Mexico city: Instituto de Biologia, Universidad Nacional de México, 492 f., 1966.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. Chave para a identificação de quirópteros brasileiros. **Boletim de Ciências, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras**. São José do Rio Preto, 73 f., 1973.

VRIJENHOEK, R. C.; PFEILER, E.; WETHERINGTON, P. Balancing selection in a desert stream-dwelling fish, *Poeciliopsis monacha*. **Evolution**. v. 46, p. 1642-1657, 1992.

WADE, M. J.; ARNOLD, S. J. The intensity of sexual selection in relation to male sexual-behavior, female choice, and sperm precedence. **Animal Behaviour**. v. 28, p. 446-461, 1980.

WAITS, L.; TABERLET, P.; SWENSON, J. E.; SANDEGREN, F.; FRANZEN, R. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctus*). **Molecular Ecology**. v. 9, p. 421-431, 2000.

WANG, J. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. **Genetics**. v. 166, p.1963-1979, 2004.

WANG, J. **Colony® V.2.0**. Zoological Society of London. 2008. <http://www.zsl.org/science/research/software/>. Acesso em: 10/fev/2010.

WANG, J. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. **Molecular Ecology**. v. 18, p. 2148-2164, 2009.

WANG, J.; SANTURE, A. W. Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. **Genetics**. v. 181, p. 1579-1594, 2009.

WAPLES, R. S. Genetic methods for estimating effective population size of Cetacean populations. In: **Genetic Ecology of Whales and Dolphins**. HOELZEL, A. R. (Ed.), p. 279-300. Cambridge: International Whaling Commission, Special Issue 13, 1991.

WEAVER, K. N.; ALFANO, S. E.; KRONQUIST, A. R.; REEDER, D. M. Healing rates of wing punch wounds in free-ranging little brown myotis (*Myotis lucifugus*). **Acta Chiropterologica**. v. 11, n. 1, p. 220-223, 2009.

WILKINSON, G. S. Reciprocal food sharing in the vampire bat. **Nature**. v. 308, n. 8, 1984.

____ The social organization of the common vampire bat. II. Mating system, genetic structure, and relatedness. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 17, p. 123-134, 1985.

____. Social Organization and Behavior, *In: Natural History of Vampire Bats*. GREENHALL, A.M. & SCHMIDT, U. (Eds.). Florida: CRC Press. p. 85-95, 1988.

____ Food sharing in vampire bats. **Scientific American**. v. 262, n. 2, p. 64-70, 1990.

WIMSATT, W. A Responses of captive common vampires to cold and warm enviroments. **Journal of Mammalogy**. Lowrence, v. 43, n. 2, p.185-191, 1962.

WORTHINGTON-WILMER, J.; BARRATT, E. M. A nonlethal method of tissue sampling for genetic studies of chiropterans. **Bat Research News**. v. 37, p. 1-3, 1996.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**: The theory of gene frequencies. Vol.2. Chicago e Londres: University of Chicago Press, 512f., 1969.

WRIGHT, J.M.; BENTZEN, P. Microsatellites: genetic markers for the future. **Reviews of Fish Biology**. v.4, p.384-388, 1994.

EPÍLOGO

O conhecimento de parentesco é importante no contexto comportamental e ecológico. O acasalamento é difícil de observar na maioria das espécies selvagens, mas o comportamento reprodutivo, variabilidade genética e o tamanho efetivo da população podem ser deduzidos através de informações moleculares de maternidade e paternidade. Que por sua vez, pode contribuir para o conhecimento da ecologia e evolução do sistema reprodutivo da espécie.

Do ponto de vista genético o tamanho efetivo da população (N_e) é mais importante do que o tamanho populacional obtido através de censos (N), sendo influenciados, por exemplo, pelos desvios na proporção sexual dos indivíduos reprodutivos. Populações cujo N_e está sendo reduzido são mais suscetíveis a apresentar aumento da identidade por prole, efeito da deriva genética sobre o tamanho e a composição da população, além da perda da diversidade genética e suas consequências. Portanto a detecção de um N_e é necessária para evitar a ameaça da população ou extinção local de *Desmodus rotundus*.

A partir das inúmeras ameaças das atividades humanas diretas e indiretas aos sistemas naturais, faz-se necessário algo para amenizar esta destruição, unindo esforços para proteger as espécies (atualmente ameaçadas ou não) e os ecossistemas já degradados e aqueles com potencial iminência à degradação, como os ambientes cavernícolas. Além disso, espero estimular esforços para utilizar conceitos de Genética da Conservação e suas ferramentas disponíveis de impacto mínimo objetivando o conhecimento da biologia, ecologia, e *status* de conservação de *Desmodus rotundus*, que apesar de causar prejuízos econômicos e de saúde pública, apresenta também uma importância ecológica no ambiente em que vive.